

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**PRODUCCIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO (*Azotobacter*,
Bacillus y *Pseudomonas*); EN MEDIO LÍQUIDO A BASE DE MELAZA, PARA SU
APLICACIÓN EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.) EN
AZUCARERA EL VIEJO, GUANACASTE, COSTA RICA.**

Ana Cristina Agüero Murillo



CARTAGO, 2009



Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*); en medio líquido a base de melaza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Azucarera El Viejo, Guanacaste, Costa Rica.

Ana Cristina Agüero Murillo*

RESUMEN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp), uno de los cultivos agrícolas más importantes de Costa Rica, requiere de un programa de fertilización continua; siendo el nitrógeno uno de los minerales esenciales. La bio-fertilización empleando microorganismos diazótrofos podría sustituir en un porcentaje, sino por completo, el uso de fertilizantes sintéticos, reforzando los pasos hacia una agricultura sostenible. Por esto, el objetivo de la presente investigación fue ejecutar un protocolo para la producción de bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*; en medio líquido a base de melaza, para su aplicación en el cultivo. Mediante el uso de medios semisólidos se logró aislar bacterias de los géneros *Bacillus* y *Azotobacter*. Se observó que los microorganismos crecían a altas concentraciones en lapsos cortos de tiempo en las fermentaciones aeróbicas tipo batch ejecutadas. La mayor concentración registrada fue de $5,1 \times 10^8$ células/mL en melaza al 10% p/v para *Bacillus* y de $6,0 \times 10^8$ células/mL al 5% p/v para *Azotobacter*; ambos a las 32h. Es conclusión, el medio logró propiciar el crecimiento bacteriano hasta obtenerse concentraciones comparables con las empleadas en productos comerciales.

Palabras claves: caña de azúcar, bio-fertilización, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, fermentación, diazótrofos.

Production of nitrogen-fixing bacteria (*Azotobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas*) in molasses-based liquid media, for its' application in the sugarcane (*Saccharum* spp.) culture in Azucarera El Viejo, Guanacaste, Costa Rica.

Ana Cristina Murillo Agüero

ABSTRACT


Sugarcane (*Saccharum* spp), one of the most important agricultural crops in Costa Rica, requires a continuous program of fertilization, being nitrogen one of the essential minerals. The bio-fertilization using nitrogen-fixing microorganisms could replace a percentage, if not altogether, the use of synthetic fertilizers, reinforcing steps towards sustainable agriculture. Therefore, the objective of this research was to implement a protocol for the production of nitrogen-fixing bacteria of the genera *Azotobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* in a liquid medium based on molasses, for its' application to the crop. Through the use of semi-solid media bacteria of the genera *Azotobacter* and *Bacillus* were isolated. It was noted that microorganisms grew at high concentrations in short periods of time Turing the aerobic batch fermentations performed. The highest concentration recorded was 5.1×10^8 cells/mL in molasses 10% w/v for *Bacillus* and 6.0×10^8 cells/mL 5% w/v for *Azotobacter*, both at 32h. It is concluded, that the medium was able to promote bacterial growth, obtaining concentrations comparable with those used in commercial products.

Keywords: sugarcane, bio-fertilizers, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, fermentation, nitrogen-fixing bacteria.

Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*); en medio líquido a base de melaza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Azucarera El Viejo, Guanacaste, Costa Rica.

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal



Virginia Montero Campos

Profesor Asesor-ITCR



Msc. Fermín Subirós
Asesor- Azucarera El Viejo S.A.



Dr. Eugenio González
Lector

A Dios, por el cual todas las cosas fueron hechas, y sin el cual nada de lo que ha sido hecho, fue hecho; quien me dio el soplo de vida y la sabiduría. A mi familia, especialmente a Laura y a mi abuela Norma; trascendentales en mi vida, quienes me acompañan durante el camino dándome aliento, consejo y amor.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas por su colaboración en el presente trabajo:

A la empresa Azucarera El Viejo S.A. por la oportunidad brindada y muy especialmente al Ing. Fermín Subirós por su dedicación y disponibilidad en todo momento, por su guía incondicional y por su apoyo y cariño durante el desarrollo del proyecto; fue un placer trabajar con usted. Así mismo a Jorge Bello por toda la ayuda brindada y la buena disposición al hacerlo.

A la Dra. Virginia Montero, profesora guía, por su asistencia en el trabajo de laboratorio en el CEQUIATEC y sus múltiples consejos.

Al Dr. Eugenio González simplemente por estar ahí, siempre conmigo, antes, durante y después del proceso de elaboración de la tesis. Más que educación es cuestión de formación.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT	iii
AGRADECIMIENTOS.....	vi
INDICE GENERAL	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE ANEXOS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
1. La Caña de Azúcar.....	4
1.1. Origen y taxonomía	4
1.2 Generalidades	5
2. El Nitrógeno en la Caña de Azúcar.....	9
2.1. Ciclo del nitrógeno	10
2.2 Fertilización.....	10
3. Agricultura Sostenible.....	12
3.1. Bio-Fertilizantes	12
4. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).....	14
4.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida.....	15
4.1.1. Enzima Nitrogenasa	16
4.1.2. Protección de la Nitrogenasa.....	17
4.2. El género Azotobacter	17
4.3. El género Bacillus	19
4.4. El género Pseudomonas	21
5. La FBN en Caña de Azúcar.....	23
OBJETIVOS	25
Objetivo General.....	25
Objetivos específicos.....	25
METODOLOGÍA.....	26

1. Tinción diferencial de Gram en INCÓGNITA.....	26
2. Aislamiento de bacterias.....	26
2.1. Azotobacter spp.....	26
2.2. Bacillus spp.....	27
2.3. Pseudomonas spp.....	27
2.4. Tinción diferencial de Gram.....	27
3. Fermentaciones.....	28
3.1. Inóculo.....	28
3.2. Evaluación de la concentración de melaza.....	28
4. Conteo en Placas.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
1. Tinción diferencial de Gram en INCÓGNITA.....	30
2. Aislamiento de bacterias.....	30
2.1. Azotobacter spp.....	30
2.2. Bacillus spp.....	31
2.3. Pseudomonas spp.....	32
2.4. Tinción diferencial de Gram.....	35
3. Fermentaciones.....	36
3.1. Inóculo.....	37
3.2. Evaluación de la concentración de melaza.....	37
4. Conteo en Placas.....	37
CONCLUSIONES.....	43
RECOMENDACIONES.....	44
Referencias Bibliográficas.....	45
ANEXOS.....	49
Anexo 1. Tinción Gram.....	49
Anexo 2. Agar Sulfato Manitol.....	51
Anexo 3. Imágenes del crecimiento en placa para conteo de UFC.....	52

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Observación a 100x de tinción diferencial de gram de INCÓGNITA.	30
2	Aislamiento de <i>Azotobacter</i> en medio semisólido.	31
3	Crecimiento de colonias del género <i>Bacillus</i> asiladas en agar RT.	32
4	Crecimiento en Mc Conkey de bacterias presentes en INCÓGNITA.	33
5	Resultados del Api20E para colonias en McConkey	33
6	Crecimiento de bacterias en medio Cetrimide de la muestra INCÓGNITA.	34
7	Resultados del Api20E para colonias en Cetrimide.	35
8	Tinción gram de los cultivos aislados observados al microscopio (100x). A: Bacilo gram negativo B: <i>Azotobacter</i> C: <i>Bacillus</i> .	36
9	Control de fermentación	41
10	Crecimiento de <i>Bacillus</i> a las 8h de fermentado a partir de muestras puras (izquierda) y diluidas 10^{-2} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).	52
11	Crecimiento de <i>Azotobacter</i> a las 8h de fermentado a partir de muestras puras (izquierda) y diluidas 10^{-2} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).	52
12	Crecimiento de <i>Bacillus</i> a las 24h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-2} (izquierda) y 10^{-4} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).	53
13	Crecimiento de <i>Azotobacter</i> a las 24h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-2} (izquierda) y 10^{-4} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).	53
14	Crecimiento de <i>Bacillus</i> a las 32h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).	54
15	Crecimiento de <i>Azotobacter</i> a las 32h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).	54

- 16 Crecimiento de *Bacillus* a las 48h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha). 55
- 17 Crecimiento de *Azotobacter* a las 48h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha). 55

INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Macrocomponentes de la miel de caña de azúcar.	7
2	Fracción inorgánica de la melaza de caña de azúcar.	7
3	Ácidos orgánicos en melaza final.	8
4	Determinación del crecimiento celular de <i>Bacillus</i> spp. en medio líquido a base de melaza al 5, 10 y 15% p/v.	40
5	Determinación del crecimiento celular de <i>Azotobacter</i> spp. en medio líquido a base de melaza a tres concentraciones.	41
6	Determinación del crecimiento celular de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Azotobacter</i> sp. en caldo tripticasa soya	41

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Tinción Gram	50
2	Agar Sulfato Manitol	51
3	Imágenes del crecimiento en placa para conteo de UFC.	52

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es uno de los cultivos agrícolas más importantes de Costa Rica. Se estima que hay plantadas alrededor de 48000 hectáreas que produjeron cerca de 3,56 millones de toneladas de caña en la zafra 2007-2008 y 390 000 toneladas métricas de sacarosa (Chaves, 2006; CNAA, 2009).

La zona de mayor producción en el país es Guanacaste, donde se cosecha cerca de la mitad de la producción del total nacional (Barquero, 2006). En esta provincia se localizan los ingenios Taboga, CATSA y Azucarera El Viejo (Subirós, 1995). Este último está ubicado en el pueblo La Guinea, del distrito de Filadelfia, cantón Carrillo.

La planta de caña es un híbrido muy complejo que pertenece al género *Saccharum*, familia Poaceae (Moore y Maretzki, 1996). Este monocultivo posee altos requerimientos nutricionales en consideración a su elevada capacidad de extracción y remoción de nutrimentos del suelo, y a su alta producción de materia verde y seca. Por esto es que el manejo de la nutrición es un aspecto crucial desde el punto de vista fisiológico y económico (Subirós, 1995). El factor limitante de mayor impacto en la productividad de los cultivos es, después del agua, el nitrógeno (N) (Villalobos, 2001). Como macroelemento esencial que es, cumple funciones importantes en el desarrollo de la planta y representa entre el 1 y 5% de su peso. Éste es absorbido por las raíces de la solución del suelo tanto en forma nítrica (NO_3^-) como amoniacal (NH_4^+) (Kass, 1996; Villalobos, 2001). Consecuentemente, este elemento debe estar disponible en cantidad suficiente para asegurar una buena producción agrícola y de sacarosa.

Tomando en consideración que todos los suelos de las zonas cañeras de Costa Rica presentan bajos niveles de N, es necesario incluir dentro del programa de fertilización este nutrimento (MAG, sf; Subirós, 1995). En Azucarera El Viejo, las necesidades de N se suplen empleando fertilizantes químicos, siendo el más usual la urea. Éste representa un costo aproximado de \$1,03/Kg (Subirós, 2009). Aunque son insumos que contribuyen de manera apreciable en la rentabilidad

del cultivo, representan un rubro importante en los costos de producción, más aún con las fuertes alzas que se han presentado en los últimos años. El N proveniente de los fertilizantes sufre pérdidas significativas por lixiviación (principalmente como nitrato), volatilización, desnitrificación y fijación (fijación del NH_4 en las arcillas); y en consecuencia, no todo el producto aplicado está disponible, ni puede utilizarlo la planta. Inclusive, se debe prestar atención también a los costos ambientales, considerando la contaminación de mantos freáticos, entre otros.

Esta fertilización es necesaria a pesar de que la atmósfera está constituida por aproximadamente 80% de N, ya que las plantas no pueden aprovecharlo directamente. No obstante, en la naturaleza existen microorganismos capaces de tomar el nitrógeno molecular de la atmósfera (N_2), molécula casi inerte debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, y reducirlo hasta compuestos disponibles. Este proceso conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN por sus siglas en español), puede ser llevado a cabo por microorganismos de vida libre o en simbiosis con plantas (Allan y Graham, 2002; Parsons, 2004). Entre estos microorganismos se mencionan las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes, las cuales ocupan un nicho ecológico indispensable, ya que suplen de nitrógeno fijado al ciclo global del nitrógeno. Éstas poseen la enzima nitrogenasa, encargada de la ruptura del triple enlace del nitrógeno molecular y de la formación de amoníaco (Corvera, 2000).

Existen muchas especies de bacterias capaces de realizar la FBN. Sin embargo, entre ellas cabe nombrar el género *Azotobacter*, de la familia Azotobacteriaceae, microorganismos aerobios, fijadores de nitrógeno comunes, capaces de tomar de manera eficiente el N del aire, para que luego las plantas lo aprovechen en forma de nitrato o amonio (Paustian, 2006). La capacidad enzimática de las especies encontradas en los suelos de la caña logra reducir 179 nanomoles de nitrógeno por bacteria en una hora. En términos agronómicos, algunas cepas aisladas llegan a fijar entre 50 y 80 kg de N/ha al año (Rojas, 2001).

El género *Pseudomonas*, que pertenece a la familia Pseudomonadaceae, está ampliamente difundido en la naturaleza. Son microorganismos gram negativos, aerobios, móviles y que no forman esporas. *Pseudomonas stutzeri* es un ejemplo de bacteria fijadora de nitrógeno (Krotzky y Werner, 1985; Mallolas y Vila, 2002). Y las especies del género *Bacillus*, familia Bacillaceae, con la inusual resistencia de sus endosporas a agentes químicos y físicos, la producción de antibióticos, la fijación de nitrógeno, entre otros, han atraído y mantenido el interés en el género desde la época de Koch. Algunos ejemplos de especies fijadoras de nitrógeno son *B. macerans* y *B. polymyxa* (Todar, 2006).

El conocimiento y cultivo de estas bacterias nos conduce a la posibilidad de desarrollar inoculantes que al ser incorporados al suelo incrementan la concentración de la bacteria en la rizósfera, aumentando de este modo la probabilidad de obtener un efecto benéfico sobre el cultivo. Es decir, a partir de estas bacterias, y debido a su capacidad, se puede producir un biofertilizante; producto que puede mejorar la sostenibilidad del cultivo de caña de azúcar. Adicionalmente esta inoculación persigue reducir las necesidades de fertilizantes nitrogenados sintéticos. En general la biofertilización es una práctica que consiste en seleccionar microorganismos útiles y eficientes, cultivarlos y agregarlos a los suelos (Arauz, 1997).

Considerando la relevancia de la biofertilización es que en Azucarera El Viejo se efectuaron evaluaciones tendientes a sustituir de manera parcial el fertilizante químico por el biológico. Los resultados concluyen que es factible sustituir hasta 50% del N sin afectar la producción y las variables de calidad de la caña (Subirós y Bello, 2007). Los resultados satisfactorios obtenidos motivaron la realización de la presente investigación, cuyo objetivo fue ejecutar un protocolo para la producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (géneros *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*) empleando un medio líquido a base de melaza; para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en terrenos de la empresa.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. La Caña de Azúcar

1.1. Origen y taxonomía

La caña de azúcar, también conocida como caña dulce o cañamiel, es un híbrido muy complejo entre dos o más de las cinco especies del género *Saccharum*; a saber, *S. barberi*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinensis* y *S. spontaneum*. Las especies tuvieron cruzamientos naturales, originando un género muy diverso. *Saccharum spontaneum*, *sinensis* y *barberi* se desarrollaron en el área de Birmania, China, e India en Asia meridional. Cuando dichas especies se extendieron a otras regiones tuvieron diversos cruzamientos con otras gramíneas, apareciendo las especies *S. robustum* y *S. officinarum* en las islas del sureste de Indonesia, y en el área de Nueva Guinea respectivamente (MAG, sf.; Subirós, 1995).

No existe información que indique exactamente cuándo fue introducida en Costa Rica; sin embargo, se presume que fue Pedrarias Dávila, en 1530, quien la trajo por primera vez (Subirós, 1995).

Taxonómicamente se clasifica de la siguiente forma:

División: Embryophita siphonogama.

Subdivisión: Angiospermae.

Clase: Monocotiledóneae.

Orden: Glumiforae.

Familia: Poaceae.

Tribu: Andropogonae.

Subtribu: Saccharae.

Género: *Saccharum*.

1.2 Generalidades

Históricamente el cultivo y la industrialización de la caña de azúcar han constituido una de las principales actividades económicas de Costa Rica. La creación de la Sección de Caña de Azúcar en el Ministerio de Agricultura e Industrias (MAI) en 1950, proporcionó un nuevo rol a la actividad cañera al asignar recursos económicos y humanos. Más aún, se crea la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA) en 1965, institución pública sin fines de lucro que aglutina a la Federación de Cámaras de Productores de la Caña y a la Cámara de Azucareros. Ésta a la fecha registra 17 ingenios en el país, de los cuales 16 están activos y son los encargados de procesar la producción de 7.000 agricultores (Barquero, 2006).

Esta actividad genera trabajo, recursos financieros al país y suple las necesidades internas de azúcar. En el aspecto de la generación de trabajo, se calcula que emplea de forma permanente a 20.000 trabajadores (entre productores independientes y personal de las plantas procesadoras) más una cantidad importante de trabajadores que se incorporan temporalmente a las labores de zafra. Se ha estimado en 30.000 los trabajadores vinculados en la actividad. Por otra parte, en la zafra 2003-2004 esta actividad generó ingresos en el orden de los \$42 millones de dólares por concepto de exportación (Acuña, 2004).

En el país existen seis zonas cañeras bien tipificadas: Guanacaste, Puntarenas, San Carlos, Turrialba (Juan Viñas), la Zona Sur y el Valle Central. El grupo de ingenios del Pacífico Seco (Guanacaste y Puntarenas) aporta la mayor producción en las diferentes zafras, pues conforma el 25% del total de ingenios en el ámbito nacional y representa un 59% del total de toneladas métricas de caña de azúcar cortada y un 55% del total de azúcar producido. En esta región se localizan los ingenios Taboga, CATSA, El Palmar y Azucarera El Viejo (Subirós, 1995).

Previo al proceso industrial, la planta debe completar satisfactoriamente las fases de germinación, crecimiento y maduración, para lo cual debe contar con condiciones favorables en el campo. Dentro de los factores ambientales, la temperatura, el viento, la humedad y la luminosidad, son los que más influyen en su desarrollo (Acuña, 2004; Chaves, 1999). Esta especie posee un ciclo de desarrollo vegetativo variable cuya duración depende básicamente de las características del material genético utilizado y de la influencia que el clima ejerce en este proceso biológico. En Costa Rica varía entre 9 y 24 meses de edad en relación casi directa con el piso altitudinal (0-1550 msnm). Las plantaciones cultivadas por debajo de 1000 msnm poseen un ciclo de 9 a 14 meses. Este cultivo es semiperenne, a la primera siembra se le denomina caña planta y los rebrotes siguientes, luego de realizada la corta y cosecha de la plantación, caña soca.

Económicamente hablando, el tallo es el órgano de mayor importancia ya que en él se almacenan los carbohidratos producto de la fotosíntesis. Éstos se van acumulando en los entrenudos inferiores disminuyendo su concentración a medida que se asciende (Moore y Marezki, 1996; Subirós, 1995). En promedio, este órgano posee una riqueza de sacarosa del 14%, pero esto varía según la época del año, las condiciones meteorológicas, la variedad, si el campo se ha quemado o no, y la duración del intervalo entre la cosecha y la elaboración (Rivacoba y Morín, 2005). Por medio del proceso industrial se obtiene la sacarosa y otros derivados como melaza, bagazo y cachaza.

Actualmente, uno de los principales problemas a nivel mundial en las agroindustrias, es la gran cantidad de desechos o subproductos orgánicos, que se obtienen del procesamiento de la materia prima, como lo es la melaza. Este subproducto puede ser utilizado como materia prima para la obtención biotecnológica de sustancias de alto valor comercial (Sibaja *et al.*, 2007), La composición de la melaza varía dependiendo de la operación a nivel de industria y agrícola; así como variables asociadas a la planta de caña de azúcar, como variedad y estado de maduración (Subirós, 1995). Pero por otro lado, posee una

riqueza de componentes que la hacen idónea para el crecimiento de una amplia gama de microorganismos. En general se puede decir que está formada principalmente por sacarosa, agua y cenizas, en orden decreciente (Cuadro 1) (Vega *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Macrocomponentes de la miel de caña de azúcar.

Componente	%
Agua	20
Sacarosa	35
Glucosa	7
Levulosa	9
Sustancias reductoras	3
Otros carbohidratos	4,1
Cenizas	12
Compuestos nitrogenados	4,5
Compuestos no nitrogenados	5
Ceras, esteroides y esterofolípidos	0,4

La fracción inorgánica es de importancia vital por su influencia en los procesos fermentativos. En las mieles de caña se han identificado numerosos cationes ocupando el potasio, el calcio y el magnesio más del 98% del total (Cuadro 2).

Cuadro 2. Fracción inorgánica de la melaza de caña de azúcar.

Catión	mg kg ⁻¹	Cation	mg kg ⁻¹
Ag	1,01	Mg	3 013
Al	63,0	Mn	13,9
Ag	6,5	Na	98,3
Ca	8 800	Ni	4,9
Co	1,7	Pb	3,7
Cr	2,5	Zn	13,3
Cu	16,6	Fe	519,0
K	31 800	Cd	0,15

Además, el 1% de las mieles lo componen los aminoácidos, entre los que predominan los ácidos aspártico y glutámico que constituyen más del 70% del total. El nitrógeno total de las melazas, varía entre 0,4% y 1,5% del peso total de la melaza. Las vitaminas con mayor presencia son la inositina, riboflavina, ácido

pantoténico, tiamina y la biotina. Los fenoles encontrados en las mieles finales son derivados de los ácidos hidroxicinámico y p-hidroxibenzoico. Desde el punto de vista fermentativo, los fenoles, o algunos de ellos, son indeseables por presentar actividad inhibitora sobre el crecimiento, a concentraciones de 0,5g/l. Además, se han detectado ácidos orgánicos volátiles y ácidos grasos (Cuadro 3), siendo la mayoría de ellos asimilables por los microorganismos. Sin embargo el ácido butírico puede ser un fuerte inhibidor de crecimiento por encima de 40 mg kg⁻¹ (Curtin; 1983; Fajardo; 2007).

Cuadro 3. Ácidos orgánicos en melaza final.

Ácido Orgánico	mg kg ⁻¹
Acético	324
Propiono	60
Butírico	91
Valérico	3,4
Isovalérico	3,5
Láurico	0,3
Mirístico	0,34
Palmítico	0,05
Esteárico	0,009
Oleico	0,01
Linoleico	0,02
Linolénico	0,003

Las mieles durante su almacenamiento sufren cambios como pérdida de sacarosa, ganancia de azúcares reductores, incremento del porcentaje de compuestos orgánicos no azúcares, pérdida de sólidos totales, y gran incremento de color. El contenido de glucosa y fructosa en las melazas puede variar a causa de la hidrólisis de la sacarosa, a valores de pH ácido y a temperaturas altas. Por otro lado, la descomposición se atribuye principalmente a la reacción de las sustancias orgánicas, con los azúcares reductores, formándose impurezas coloidales coloreadas, con alto contenido de carbono. Estos productos llegan a contener entre un 15 y 50% del nitrógeno total de la melaza, en forma no asimilable por los microorganismos. Los cambios químicos son influidos por la temperatura ya que en particular son muy rápidos por encima

de 40 °C. Además, entre las reacciones muchos compuestos producidos tienen actividad inhibidora e incluso mutagénica y pueden, por tanto, ser responsables de la baja capacidad fermentativa de algunas mieles (Ertola *et al.*, 1994; Fajardo; 2007).

2. El Nitrógeno en la Caña de Azúcar.

El N es un elemento mineral esencial importante en el desarrollo de las plantas (Villalobos, 2001). Cuando el cultivo de caña de azúcar cuenta con las cantidades adecuadas de N mejora el macollamiento, altura, grosor y peso de los tallos. Por el contrario, su insuficiencia provoca un desplazamiento de este elemento móvil desde las hojas más viejas hacia los tejidos nuevos donde se le requiere; adquiriendo la sección baja de la planta una coloración verde amarillenta, luego amarilla y en ocasiones llega a necrosarse. También causa una mala brotación de los esquejes durante la siembra y una reducción en la cantidad de brotes. Bajo estas condiciones los tallos se tornan delgados y maduran prematuramente, y generalmente disminuye el crecimiento de la planta. Sin embargo, un exceso de N también provoca efectos adversos en el desarrollo del cultivo, ocasionando un incremento en la relación parte aérea/ raíz y aumentando la susceptibilidad de la planta ante algunas enfermedades. Adicionalmente, aplicaciones excesivas tardías afectan la calidad del jugo al reducir su pureza al aumentar los azúcares reductores (Subirós, 1995; Subirós, 1998).

En vista de que la mayoría de los suelos son deficientes en N, particularmente en los trópicos debido a que este elemento no forma parte del material parental que origina el suelo, y también por la gran susceptibilidad del elemento a la volatilización y a la lixiviación; es que se vuelve crucial el manejo de la nutrición de las plantas (Villalobos, 2001).

2.1. Ciclo del nitrógeno

Las moléculas de nitrógeno molecular están en equilibrio dinámico con las diversas formas fijadas en el suelo. El reciclaje de nitrógeno en el sistema suelo-planta-atmósfera depende de muchas transformaciones entre formas inorgánicas y orgánicas del elemento. En el ciclo del nitrógeno se encuentran entradas, salidas y reciclaje dentro del suelo; y con excepción de la fijación por combustión y por procesos industriales, todos los procesos ocurren naturalmente (Kass, 1996).

2.2 Fertilización

La fabricación de fertilizantes nitrogenados emplea amoníaco producto de una reacción de nitrógeno e hidrógeno gaseosos, conocida como proceso Haber Bosch. Éste requiere el uso de un catalizador de hierro con promotores basados en óxidos de Al, Ca y K. Las condiciones de operación son de 100-300 BAR y 500-700°C aproximadamente; por el que se llegan a producir más de 100 millones de toneladas de amonio al año (Otero, 2008).

El uso intensivo de fertilizantes nitrogenados puede representar altos costos ambientales. Entre los efectos más significativos se encuentra el proceso de percolación de nitrógeno, en especial nitratos, desde los suelos a las corrientes de agua; lo cual contribuye a los procesos de eutrofización de lagos y ríos; impidiendo la vida de los peces, causando la propagación de malezas acuáticas y dificultando la navegación. Además, los nitratos se transforman en nitritos, que al ser absorbidos por el ser humano causan efectos negativos en la salud. La mayor incorporación de N a la atmósfera en forma de óxidos tiene efectos sobre la capa de ozono y, por lo tanto, la radiación UV que llega a la tierra. La fertilización excesiva puede llevar a un incremento en la descomposición de la materia orgánica con la consiguiente emisión de dióxido de carbono. Adicionalmente, el ciclo del nitrógeno se ve afectado por la intervención

antropogénica, y este ciclo a su vez interactúa con otros ciclos que también se verían perjudicados (Bifani, 1999).

Por otro lado, debido al uso tan amplio y al costo que representa la fertilización nitrogenada, es uno de los elementos que requiere mayor atención en relación con su eficiencia. La urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) es la fuente nitrogenada que se emplea con mayor frecuencia en el cultivo de la caña. Posee cerca del 46% de N y es por lo general una de las más baratas por unidad de este elemento. La urea debe hidrolizarse primero como amonio y luego nitrificarse mediante bacterias aeróbicas. El sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) es muy soluble en agua pero poco higroscópico y no debe emplearse en suelos ácidos. Es un fertilizante en forma de cristales blancos que posee 21% de N y 23.7% de S. El nitrato de amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) es otra fuente nitrogenada, pero muy higroscópica y soluble. Se caracteriza por poseer 33.5% de N, en dos formas: nítrica (16.75%) y amoniacal (16.5%). Es la fuente con más rápida acción sin embargo, bajo condiciones de alta precipitación se lixivia de manera considerable (Subirós, 1995).

El programa de fertilización en Azucarera El Viejo inicia aplicando durante la siembra, en caña planta, 20 kg/ha de N y 100 kg/ha de P_2O_5 ; y aproximadamente a los 2 meses de edad se adiciona un complemento de N (80 kg/ha). En las socas se aplica 130 kg/ha de N en combinación con S (28 kg/ha) y Zn (28 kg/ha). A grandes rasgos se puede decir que el costo por nutriente es de \$1,03/kg de N, \$5,93/kg de P, \$2,00 kg/ de K, \$1,81 kg/ de S y \$3,20/ kg de Zn. (Subirós, 2009).

3. Agricultura Sostenible

Como bien se sabe, la caña de azúcar es un cultivo que en esencia persigue producir la mayor cantidad de sacarosa por unidad de área al menor costo; pero se ha introducido un nuevo concepto, que es lograr los resultados antes citados causando la menor alteración posible al ambiente (Subirós, 1995). Además, debido al sistema de monocultivo a largo plazo y el uso excesivo de la tierra, el rendimiento de la caña de azúcar ha ido declinando. Se ha encontrado que la disminución de este rendimiento está altamente relacionada al daño a los insectos del suelo, presencia de fitopatógenos, desequilibrio de los microorganismos, la acumulación de toxinas y compactación por la maquinaria pesada (Ming-Muh y Te-Shang, 1986). Es por esto que se ha tendido a buscar una producción agrícola sostenible, la cual, se sabe, depende mucho de la buena salud del suelo; ya que garantiza la combinación óptima de los componentes orgánicos e inorgánicos del mismo (Arauz, 1997).

En la búsqueda de alternativas para incorporar nitrógeno al cultivo se ha trabajado con bio-fertilización. La melaza se ha convertido en un subproducto valioso pues forma parte de estudios microbiológicos con miras a la sustitución, parcial o total, de los fertilizantes químicos. La producción de bio-fertilizantes busca una alternativa de menor costo y que incremente la eficiencia energética mediante la reducción en los requerimientos de transportación de insumos y productos (Chaves, 1999).

3.1. Bio-Fertilizantes

Debido a la respuesta espectacular que se obtiene en un cultivo al aplicarle un fertilizante altamente concentrado, la fertilización orgánica fue relegada y con ella los beneficios adicionales de la materia orgánica como fuente de agentes antagonistas de patógenos habitantes del suelo, y microorganismos benéficos.

Todo esto ha llevado a un uso excesivo e irracional de estos productos sintéticos. Afortunadamente, la agricultura productivista ha cedido de manera paulatina a una agricultura racional y sostenible, donde se equilibra lo productivo, lo social y lo ecológico (Arauz, 1997). Varios factores son responsables de esta transformación, entre lo que se puede mencionar los siguientes:

- a. Los efectos negativos causados por la misma agricultura productivista.
- b. Los altos costos de los agroquímicos.
- c. La mayor concientización de los agricultores y consumidores.
- d. La investigación científica, incluyendo el desarrollo del manejo integrado de plagas y de la agroecología.
- e. La experiencia de la agricultura orgánica.

Se sabe que las plantas pueden perder por las raíces hasta un 40% de fotosintatos. La composición y cantidad de exudados varía con la especie y las condiciones abióticas. Los compuestos, como los carbohidratos y los aminoácidos, pueden ser usados por los microorganismos del suelo como nutrimentos para su crecimiento. Por lo tanto, esta zona presenta una intensa actividad microbiana (Mayz, 2004).

Se estima que el número de bacterias que se encuentran alrededor de las raíces es 10 a 100 mayor que en el resto de la masa de suelo. Existe un grupo ampliamente estudiado de rizobacterias benéficas que promueven el desarrollo de las plantas que son conocidas como PGPR (siglas en inglés de Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Este grupo incluye diferentes especies de bacterias que pueden pertenecer a los géneros: *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, entre otras. El conocimiento y desarrollo de estas bacterias nos conduce a la posibilidad de desarrollar inoculantes que al ser incorporados incrementan la concentración de las bacterias en la rizósfera, aumentando de este modo la probabilidad de obtener un efecto benéfico sobre el cultivo. Este efecto podría manifestarse en mayores rendimientos, ya sea por promoción de crecimiento, ayuda a la

absorción de nutrientes o a través del biocontrol sobre patógenos que inciden negativamente sobre el rendimiento de los cultivos (Biagro, s.f.).

Mediante la intervención del hombre es posible obtener provecho de este gran número de microorganismos útiles, debido a que se puede seleccionar aquellos que se muestren eficientes, cultivándolos y agregándolos a los suelos directamente o a través de “semillas”. La microbiología posee las herramientas necesarias para cultivar un microorganismo en un ambiente controlado artificial. Los microorganismos cultivados y empacados en material portador para el uso fácil en el campo se conocen como bio-fertilizantes. En cultivos como el de la caña de azúcar, estos productos son de mucho uso para dar sostenibilidad a la producción (Arauz, 1997).

4. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

Los microorganismos encargados de reducir el nitrógeno hasta una forma utilizable, son un ejemplo importante de microorganismos beneficiosos. La FBN no sólo permite usar el N proveniente de la atmósfera sino que también revierte o reduce la degradación del suelo (Allan y Graham, 2002; Corvera, 2000; Parsons, 2004). El N, como ya se había mencionado, es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos. En la atmósfera, el N molecular (N_2) ocupa aproximadamente el 80%; sin embargo, debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, la molécula es casi inerte. Esto implica que el N no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino sólo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados (Allan y Graham, 2002; Parsons, 2004). Estos microorganismos involucrados abarcan una gama morfológica que va desde los organismos unicelulares como las bacterias, hasta multicelulares como las cianobacterias filamentosas y los actinomicetes (Mayz, 2004). Se estima que la cantidad global de nitrógeno fijado biológicamente puede ser alrededor de 200 a 250 millones de toneladas de amonio al año. La

dificultad de una estimación fiel deriva de la gran variedad de microorganismos fijadores y de los diferentes ecosistemas posibles (Acuña, 2006).

Bien sea de vida libre o asociados, los organismos se benefician de la FBN al poder utilizar el N del aire como fuente del elemento, e incorporarlo en compuestos esenciales para su crecimiento y desarrollo. Sólo cuando mueren los microorganismos fijadores de nitrógeno es que se liberan al medio los compuestos orgánicos nitrogenados que se transforman en nitrato y amonio, que ya pueden asimilarse por las plantas o por otros microorganismos.

La fijación biológica es afectada por el pH del suelo, su estado nutricional, la velocidad promedio de fotosíntesis de las plantas y el manejo que se da a las especies vegetales. Las interacciones y la asociación entre el microorganismo y sus plantas anfitrión, así como el proceso de fijación de nitrógeno, se pueden inhibir por la presencia en el suelo de altos niveles de fertilizante agregado (Kass, 1996; Tejera *et al.*, 2005).

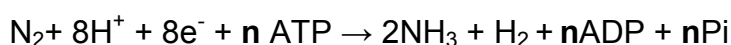
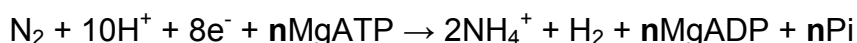
4.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes, ocupan un nicho ecológico indispensable, ya que suplen de nitrógeno fijado al ciclo global del nitrógeno. Gracias a este papel están presentes en virtualmente todos los ecosistemas, con representantes en ambientes tan variados como la superficie de los océanos (*Tricodesmium*), los nódulos de las raíces de las plantas (*Rhizobium*), y en suelos aeróbicos como es el caso de *Azotobacter* (Espín, s.f.). Entre las bacterias de vida libre pueden encontrarse las anaeróbicas obligadas o facultativas (e.j. *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.), aeróbicas obligadas (e.j. *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp.) y fotosintéticas como las bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, y bacterias verdes sulfurosas (Allan y Graham, 2002). La FBN en los suelos tropicales con las condiciones requeridas de humedad, temperatura y materia orgánica es generalmente alta. Se reporta que el número de bacterias fijadoras de nitrógeno es particularmente elevado en la zona adyacente a la raíz. Estos microorganismos son

categorizados dentro del grupo de las PGPR, al ejercer un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas. Inclusive, algunos microorganismos del suelo han mostrado capacidad para estimular el crecimiento de las plantas, promoviendo el brote de raíces secundarias y actuando como protectores contra microorganismos fitopatógenos a través de la liberación de fitohormonas y sideróforos (Torres-Rubio *et al.*, 2000).

4.1.1. Enzima Nitrogenasa

La razón por la cual Bacteria y Archaea son los únicos organismos vivos sabidos que pueden fijar el nitrógeno, es gracias a que poseen el complejo enzimático nitrogenasa (Paustian, 2006). Esta enzima está formada por dos proteínas, una que contiene hierro (proteína-Fe) y otra que contiene molibdeno y hierro (proteína Mo-Fe). La nitrogenasa que contiene Mo es la más ampliamente distribuida (Mayz, 2004). Este complejo cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ o a NH_3 bajo la reacción general:



Siendo ($n \geq 16$)

La reducción de N_2 a NH_4^+ requiere 8 electrones, por lo tanto se necesita un mínimo de 16 ATP para reducir una molécula de N_2 atmosférico. Además, la reducción de N_2 está siempre acoplada a la reducción de H^+ a H_2 . Ésta requiere la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H_2 producido por mol de N_2 reducido. Bajo condiciones fisiológicas normales el requerimiento de ATP es de 20 a 30 moléculas de MgATP, en consecuencia, la fijación de nitrógeno puede consumir una fracción significativa de la reserva celular de ATP (Mayz, 2004; Espín, s.f.). Debido a que esta reacción es extraordinariamente costosa energéticamente, la fijación de nitrógeno es el método de último recurso y la expresión del complejo de la enzima nitrogenasa es regulada firmemente por la célula (Hornick *et al.*, 2007).

4.1.2. Protección de la Nitrogenasa

En cualquier ecosistema, los diazótrofos responden a condiciones variadas del ambiente para regular el proceso de fijación de nitrógeno. Todos los diazótrofos regulan la nitrogenasa a nivel transcripcional pero algunos también poseen sistemas rápidos de regulación postranscripcional (Espín, s.f.). Estudios han demostrado que la nitrogenasa purificada es inactivada rápida e irreversiblemente por el O₂. Incluso se determinó que la proteína Fe es mucho más sensible que la proteína MoFe con una vida media en presencia de aire de 45 segundos y 10 minutos respectivamente (Robson y Postgate, 1980). Es por esto que aquellas bacterias capaces de fijar nitrógeno en condiciones de total aerobiosis poseen un sistema bien integrado de protección de su nitrogenasa que comprende protección conformacional, protección respiratoria, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos (Espín, s.f.; Mayz, 2004; Lee *et al.*, 2004; Segura y Espín, 1998 y Ureta y Nordlund, 2002).

4.2. El género *Azotobacter*

El género *Azotobacter* pertenece al dominio Eubacteria, phylum Proteobacteria, clase Deltaproteobacteria y familia Azotobacteriaceae (Hornick *et al.*, 2007). Los organismos de este género son quimio-organótrofos, catalasa positivos, gram-negativos y se reproducen por fisión binaria. Son pleomórficas, sin embargo, usualmente son células ovoides y grandes de 1,5 a 2,0 µm de diámetro. Estas bacterias se mueven por flagelos peritricos y son aerobias, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas (Espín, s.f.). Ha cautivado a científicos no sólo debido a su capacidad notable de fijar el nitrógeno, sino también porque puede hacer esto bajo condiciones atmosféricas de oxígeno (20%), en contraste con otras bacterias diazotróficas que deben fijar el nitrógeno anaerobio o microaerobiamente. Para el caso específico de *A. vinelandii*, el hidrógeno producido como subproducto de la fijación de nitrógeno se recicla de tal modo que aumenta su eficacia. Además, el ATP adicional generado vía la respiración aerobia puede utilizarlo para apoyar las altas demandas energéticas de la

nitrogenasa. Por lo tanto la fijación de nitrógeno aeróbica requiere una concentración de O₂ mínima (Hornick *et al.*, 2007).

Son capaces de utilizar una gran cantidad de fuentes de carbono, como azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos, para el crecimiento. Se calcula que fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. En 1987, Shawky encontró que la naturaleza de la fuente de carbono empleada afectaba los rendimientos de biomasa y del metabolismo del nitrógeno. En cuanto a las fuentes de N, utilizan nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es 4,8-8,5 y el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7,0-7,5 (Espín, s.f.).

Al parecer, *A. vinelandii* no puede transportar eficientemente los aminoácidos para su uso como fuentes de C o de N. La presencia de nitrogenasas alternativas y posiblemente nitrato reductasas también puede indicar que *A. vinelandii*, y otras especies de *Azotobacter* han desarrollado mecanismos extremos para obtener y para almacenar el nitrógeno, donde su nicho o hábitat en el suelo es uno en el cual las fuentes orgánicas de N no están disponibles, y que han desarrollado un genoma con un número inusual de genes necesarios para capturar el nitrógeno inorgánico (Hornick *et al.*, 2007). Se ha demostrado que las características del suelo y las condiciones de clima afectan su distribución; incluyendo el contenido de materia orgánica, la humedad, la relación de C/N y el pH (Tejera *et al.*, 2005).

En cuanto al comportamiento de *Azotobacter* en cultivos de laboratorio; se ha estudiado la respiración y las tasas de crecimiento de *A. vinelandii* respecto a la concentración de oxígeno disuelto. DiLuccio y Kirwan (1983) registraron que la tasa de fijación de nitrógeno y la actividad específica de la nitrogenasa exhiben valores máximos en las concentraciones de oxígeno disueltas de 0,02 mM (10% de saturación de aire). Por otro lado, Chen y colaboradores (1984) determinaron

que la concentración crítica de oxígeno para el crecimiento de *A. vinelandii* en laboratorio era de $0,35 \pm 0,03$ mg/L.

4.3. El género *Bacillus*

La omnipresencia de especies de *Bacillus* en la naturaleza, el ciclo de desarrollo, la inusual resistencia de sus endosporas, la producción de antibióticos, la toxicidad de sus cristales de proteínas para muchos insectos (*B. thuringiensis*), el agente patógeno *B. anthracis*, entre otros; han atraído y mantenido el interés en el género desde la época de Koch. Existe una gran diversidad en la fisiología entre los miembros del género, cuyas características incluyen la degradación colectiva de la mayoría de los sustratos derivados de plantas y animales, nitrificación, desnitrificación, fijación de nitrógeno, especies facultativas, autótrofas, acidófilas, termófilas, entre otras (Todar, 2006).

La mayoría de especies de *Bacillus* son versátiles quimioheterótrofos capaces de respirar utilizando una variedad de compuestos orgánicos simples (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos). En algunos casos, también fermentan carbohidratos en una reacción mixta que normalmente produce glicerol y butanediol. Éste es un género de bacterias en forma de bastón, Gram positivas, aerobios estrictos o anaerobios facultativos; que pertenece a la División Firmicutes, familia Bacillaceae. La mayoría son mesófilos, con temperaturas óptimas entre 30 °C y 45°C (Todar, 2006).

La formación de esporas, universalmente encontrada en el género, se piensa es una estrategia de supervivencia. Las endosporas son metabólicamente inertes y pueden soportar una variedad mucho más amplia de condiciones deletéreas que las esporas reproductivas, tales como radiación, abrasión, extremos de calor y frío, y carencia de nutrientes y agua. Al igual que una espora reproductiva, una endospora germinará y formará una célula vegetativa cuando las condiciones para el crecimiento de estas células se vuelven a presentar. Cuando los

nutrimentos comienzan a agotarse, las endosporas se producen nuevamente (Madigan *et al.*, 2004).

En vista de que la mayoría de las especies de *Bacillus* pueden degradar eficazmente una serie de biopolímeros (proteínas, almidón, pectina, etc), se supone que desempeñan un papel importante en los ciclos biológicos de carbono y nitrógeno. Ejemplo de especies fijadoras de nitrógeno son *B. macerans* y *B. polymyxa*. *B. macerans* es una bacteria bastante prominente en el suelo y en los materiales vegetales en descomposición. La bacteria sólo fija el nitrógeno en condiciones anaeróbicas porque no tienen un mecanismo de protección de su enzima nitrogenasa ante los efectos dañinos del O₂. Por el contrario, algunos ejemplos de des-nitrificadores incluye *B. azotoformans*, *B. cereus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. pasteurii*, *B. stearothermophilus* (más de la mitad de las especies reducen NO₃ a NO₂) (Todar, 2006).

Al ser anaerobios facultativos pueden persistir en ambientes con poco oxígeno, como en los suelos húmedos donde las enfermedades son particularmente severas. Estudios con evaluaciones en campo, examinando cepas supresoras de enfermedades, indican que es posible obtener un tamaño adecuado de las poblaciones de *Bacillus* spp. en la rizosfera para suprimir la pudrición de raíz, causado por *Phytium* spp., al menos en ciertas locaciones (Martin y Loper, 1999). En cuanto a manipulación en laboratorio, aislamientos primarios se pueden realizar en cualquier agar con nutrientes simples. Los cultivos stock se pueden mantener en agar con extracto de suelo o en medios especiales de esporulación (Todar, 2006). Para la identificación de estos microorganismos se realizan pruebas como lo son la presencia de catalasas y de amilasa, para las cuales se esperan resultados positivos.

4.4. El género *Pseudomonas*

Este género pertenece a la familia Pseudomonodaceae, aparte de lo cual, muestra igual distribución taxonómica que *Azotobacter*. La mayoría de las *Pseudomonas* son organismos Gram negativos, aerobios, móviles y no formadores de esporas. Además, son saprofitos de vida libre en el suelo o agua, donde desempeñan un papel importante en la descomposición, la biodegradación, y los ciclos del carbono y del nitrógeno. Debido a este estilo de vida, las *Pseudomonas* se caracterizan por una gran diversidad metabólica y son capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono. Por consiguiente, son importantes como organismos de bioremediación.

En los últimos años ha tenido lugar una reorganización taxonómica de las especies que constituían el género. En la actualidad dentro de este género encontramos a *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.stutzeri*, *P.alcaligenes* y *P.pseudoalcaligenes*, entre otras (Mallolas y Vila, 2002). Se han encontrado un número considerable de agentes supresores de enfermedades entre las *Pseudomonas* fluorescentes, convirtiendo a este grupo de bacterias en uno de los más estudiados en la producción de antibióticos en la rizósfera. Los genes para la biosíntesis de muchos de los metabolitos involucrados en la supresión de enfermedades han sido aislados, y su regulación ha sido estudiada (Handelsman y Stabb, 1996).

Además, como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, suprimen microorganismos patógenos y estimulan la acción de otros microorganismos asociados a las raíces como las micorrizas. Adicionalmente, al incrementar la disponibilidad de nutrientes como los fosfatos y el nitrógeno, promueven la producción de fitohormonas (IBO, 2007). Las bacterias de este género son capaces de colonizar el sistema radicular de plantas y formar biopelículas. Las bases moleculares de esta colonización son de momento desconocidas, pero su elucidación abrirá un amplio abanico de posibilidades para su uso como bioplaguicidas. Las cepas de *P. fluorescens* son las más comunes de las

Pseudomonas fluorescentes reportadas que suprimen el damping-off de *Phytophthora* (Martin y Loper, 1999). *P. putida* KT2440 es considerada como bioplaguicida potencial, tanto para las raíces como para las hojas, y es también un importante sistema modelo para estudiar los mecanismos bacterianos de resistencia a solventes orgánicos (CSIC, 2004). En un experimento sobre capacidad antagónica, con cepas de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*, se descubrió que todos estos microorganismos producen ácido indolacético (AIA) cuando el triptófano está presente en el medio de cultivo (Torres-Rubio *et al.*, 2000).

Los genes empleados en la fijación de nitrógeno (*nif*) se han caracterizado e investigado su regulación en muchas bacterias; sin embargo, aún es escasa la información disponible. Durante mucho tiempo se creía que no había fijadores de nitrógeno entre cepas del género *Pseudomonas sensu stricto*. Ahora parece que varias cepas clasificadas como verdad inequívoca *Pseudomonas* spp. pueden agregarse a la lista de fijadores de nitrógeno, sobre la base de propiedades fisiológicas, ensayos con nitrogenasas, estudios filogenéticos y detección de *nifH* ADN por hibridación o amplificación PCR (Hatayama *et al.*, 2005).

En 1985 se aisló un fenotipo *nif* (+) de *Pseudomonas stutzeri*, bacteria heterótrofa, microaerobia, fijadora de N_2 , de la rizosfera de un cultivar de *Sorghum nutans*. La fijación de N_2 quedó demostrada por la asimilación de $^{15}N_2$ en proteínas celulares (Krotzky y Werner, 1987). Desnoues y colaboradores (2003) aislaron dos especies de *Pseudomonas stutzeri* fijadoras de nitrógeno. Una de las cepas, CMT9.A, fue aislada de raíces de sorgo, mientras que la cepa A15 procedía de los arrozales en China. Descubrimientos de nuevos ejemplares fijadores de nitrógeno de este género continuaron, por ejemplo la cepa 6H33bT aislada de una pila de fertilizante orgánico en Japón. La actividad de la nitrogenasa de esta cepa se detectó sobre la base de su actividad de reducción de acetileno bajo concentraciones bajas de oxígeno. Un análisis de los genes responsables de la fijación de nitrógeno en esta cepa, *nifH* y *nifD*, indicaron una estrecha relación con los de *Pseudomonas stutzeri* A15 (A1501). Búsquedas de

similitud de secuencias basado en ARNr 16S mostraron que la cepa 6H33bT pertenece al género *Pseudomonas sensu stricto*, y aunque la similitud más cercana fue con *Pseudomonas indica* (97-3%), una comparación de varias características taxonómicas indicó que podían distinguirse. Por ello, análisis filogenéticos y resultados de la hibridación ADN-ADN fueron necesarios para indicar que la cepa 6H33bT representa una especie distinta, clasificada como *Pseudomonas azotifigens* sp. nov (Hatayama *et al.*, 2005).

5. La FBN en Caña de Azúcar

Luego de continuos años de investigación, se ha verificado que la caña de azúcar presenta un sistema fijador de N₂ constituido por bacterias aeróbicas, anaeróbicas y anaeróbicas facultativas, que bajo condiciones favorables, contribuyen significativamente en la economía del N y la adaptación de la planta a suelos de baja fertilidad (Chaves, 1999). Evidencias de la FBN en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) se han reportado en variedades brasileñas gracias a estudios a largo plazo del balance de N y la técnica de la dilución del isótopo ¹⁵N, demostrándose que algunas variedades pueden obtener realmente hasta 70% de sus requisitos de N por la fijación de nitrógeno (Tejera *et al.*, 2005).

Otras investigaciones realizadas encontraron que inocular con *Azotobacter* las yemas de caña de azúcar al momento del transplante, y la inmersión de las raíces al momento de la siembra, origina un incremento en la velocidad de germinación. También se observó una mejoría en el establecimiento del material trasplantado, en el desarrollo de las raíces, el macollamiento, la altura y número de tallos móviles. Todo lo anterior resultó en un incremento de la producción por unidad de área (Erazo, sf). Desde otro punto de vista, en el Congreso Internacional de la Caña de Azúcar realizado en Australia en 1997, se demostró que con la aplicación de *Azotobacter* y *Azospirillum* se puede reducir las pérdidas de nitrógeno (NO₃) por lavado, permitiendo la aplicación hasta de

400kg de N sin que se presenten riesgos ambientales. Los niveles de pérdidas están entre los valores permitidos y se estima que es posible hacer una reducción de al menos el 20% de fertilizante nitrogenado sin afectar la producción. Adicionalmente, en Río de Janeiro, Brasil, Dobereiner (1992) encontró que con la inoculación de bacterias diazotróficas en caña de azúcar se pueden fijar hasta 150kg de N por hectárea año (Erazo, sf).

Los elementos anteriormente citados, sumados al estudio ejecutado por Subirós y Bello (2007) en Azucarera El Viejo, justifican la realización de este proyecto de investigación. Los investigadores, luego de comparar el efecto de la fertilización química convencional con el uso de biofertilizante y la reducción del 50 % de la dosis de fertilizante químico, demostraron que se produjo estadísticamente la misma cantidad de caña y sacarosa por hectárea.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Ejecutar un protocolo para la producción de bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*; en medio líquido a base de melaza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp) en Azucarera El Viejo, Guanacaste, Costa Rica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar las bacterias de interés a partir de una muestra incógnita y obtener cultivos puros de cada una de ellas.
- Analizar el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* en un medio líquido a base de melaza, a distintas concentraciones; y compararlo con el crecimiento en caldo tripticasa soya.
- Determinar el crecimiento bacteriano mediante la técnica de conteo directo en placa y obtener la curva de crecimiento de cada cultivo en cada ensayo.

METODOLOGÍA

Los protocolos descritos a continuación se ejecutaron en un laboratorio del Instituto Tecnológico de Costa Rica en Cartago, en octubre del 2008.

La muestra a partir de la cual se trabajó se tomó a partir de un bio-fertilizante líquido comercial el cual será conocido como INCÓGNITA, ya que su identidad no será revelada por decisión de la empresa. El contenido microbiológico reportado es el que se describe a continuación:

Azotobacter chroococcum: 10^8 UFC/mL

Bacillus subtilis (3 cepas): 10^{10} UFC/mL

Pseudomonas cepacia: 10^8 UFC/mL

Pseudomonas fluorescens: 10^9 UFC/mL

1. Tinción diferencial de Gram en INCÓGNITA

Se realizó la tinción Gram (Anexo 1) empleando reactivos de la casa comercial Prelab, en una muestra directa de INCÓGNITA. Las tinciones se observaron a 100x bajo inmersión en un microscopio marca Meiji. Se determinó la morfología y tinción de cada bacteria presente.

2. Aislamiento de bacterias.

2.1. *Azotobacter* spp.

Se vertió 0.1mL de INCÓGNITA en una placa con agar sulfato manitol y se extendió con una espátula digalski. Se procedió a incubar durante tres días a temperatura ambiente (25°C aproximadamente). Trascorrido este tiempo se

buscaron colonias grandes, viscosas e incoloras. El procedimiento se realizó por duplicado.

2.2. *Bacillus* spp.

Primeramente se calentaron 5mL de la INCÓGNITA en un baño de agua a 80°C durante 10min. Posteriormente se vertió 0.1mL de la muestra con una pipeta en una placa con medio recuento estándar marca OXOID y se extendió con una espátula digalski. La incubación a 35°C se mantuvo por 24 horas. El procedimiento se realizó por duplicado.

2.3. *Pseudomonas* spp.

Con una pipeta se vertió 0.1mL de INCÓGNITA en una placa petri con medio McConkey marca OXOID. Ésta se incubó por 24 horas a una temperatura de 35°C. Posteriormente se realizó un repique en medio Cetrimide de una de las UFC obtenidas. El procedimiento se realizó por duplicado. A partir de un cultivo joven se realizó una prueba Api 20E de la casa comercial BioMerieux.

También se realizó una inoculación directa de la INCÓGNITA en medio Cetrimide por extensión; siempre a 35°C pero por un periodo de incubación de 72 horas.

2.4. Tinción diferencial de Gram

Se ejecutó el protocolo de la tinción de Gram tomando como muestra colonias obtenidas en los procedimientos anteriores. Las muestras se observaron al microscopio hasta un aumento de 100x.

3. Fermentaciones

3.1. Inóculo

Mediante técnica aséptica, e individualmente, se inoculó 1 colonia de cada género de bacteria obtenida en medio semisólido en un tubo de ensayo con 2mL de caldo tripticasa y soya (TyS). Se incubó el inóculo por 24 horas estáticamente a las mismas temperaturas que la incubación empleada para las placas petri en el procedimiento anterior.

3.2. Evaluación de la concentración de melaza

La metodología descrita a continuación se aplicó para cada género de bacteria aislado. En 3 erlenmeyers de 125mL de capacidad se adicionaron 50mL de medio líquido a base de melaza pura al 5, 10 y 15% p/v respectivamente, con un pH ajustado en 7 y sellados con tapones de algodón estéril. Luego se agregó el inóculo previamente preparado al 1%v/v (Sección 3.1.). Se procedió a incubar a una temperatura de 25°C en agitación constante de 150 rpm. Como control negativo se utilizó un frasco con 50mL de caldo tripticasa soya sin inocular. Así mismo cada género de bacteria se inoculó en 50mL de caldo tripticasa soya marca Sigma bajo las mismas condiciones de cultivo.

4. Evaluación del crecimiento bacteriano

4.1. Conteo en Placas

El crecimiento de las bacterias en las fermentaciones se determinó por conteo directo de UFC en placas de medio RT. Mediante la técnica de vertido se agregó 1mL de cada una de las muestras y se incubó a 35°C para su observación y conteo a las 24horas. Para el conteo a las 8 horas se empleó la muestra pura y

una dilución de 10^{-2} , para los siguientes conteos a las 24, 32 y 48 horas se prescindió de las muestras puras y se emplearon diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} .

Para calcular la concentración se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = X * \text{F.Dn} / 1\text{mL}$$

x = número total de UFC

F.Dn = factor de dilución

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Tinción diferencial de gram en INCÓGNITA

A pesar de haber obtenido una tinción muy leve, se lograron observar bacilos típicos gram negativos y gram positivos; y un bacilo gram positivo ovalado y regordete (Figura 1). Existe la probabilidad que las bacterias teñidas sean de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter* respectivamente, en la INCÓGNITA; por su similitud morfológica.

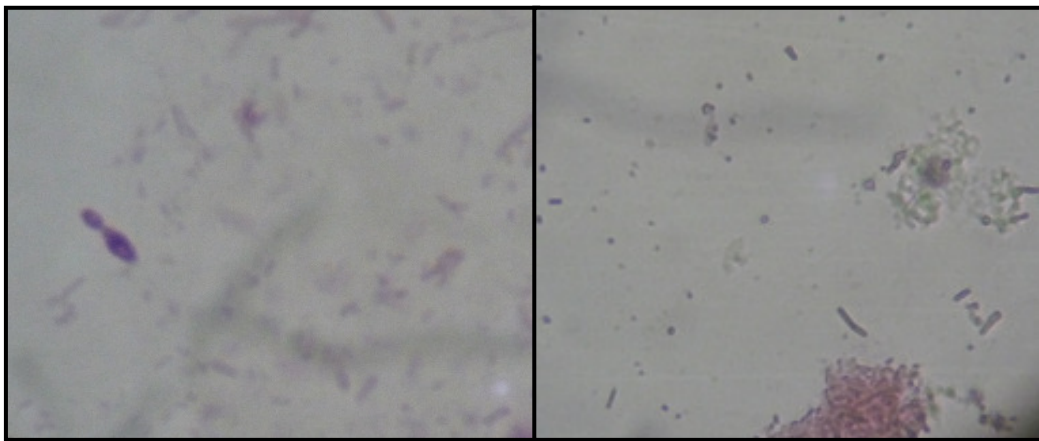


Figura 1. Observación a 100x de tinción diferencial de gram de INCÓGNITA.

2. Aislamiento de bacterias

2.1. *Azotobacter* spp.

El crecimiento de *Azotobacter* en la placa con agar sulfato manitol se observó como colonias incoloras y muy viscosas (Figura. 2). Este medio de cultivo se caracteriza por su ausencia de fuentes de nitrógeno, asegurando de esta forma que aquellos microorganismos que crecen tienen la capacidad de fijarlo a partir de la atmósfera (Montero, 2007).

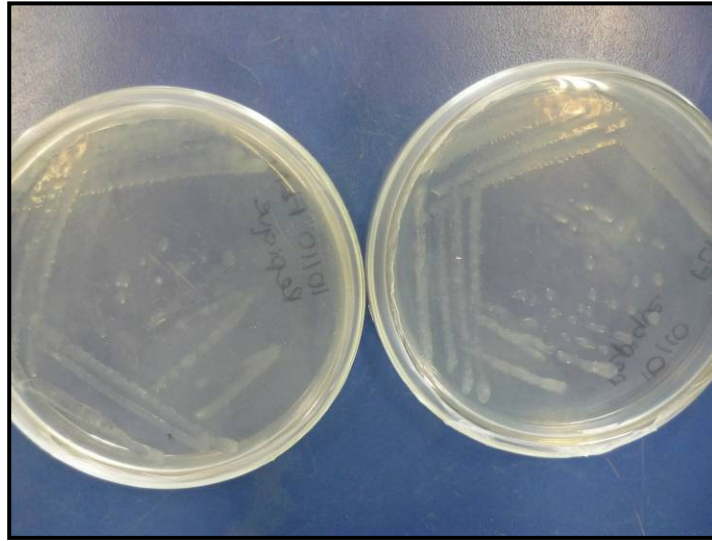


Figura 2. Aislamiento de *Azotobacter* en medio semisólido.

2.2. *Bacillus* spp.

Para el aislamiento de colonias del género *Bacillus* se empleó agar recuento estándar o recuento total (RT), el cual no posee ningún inhibidor o indicador de crecimiento, y permite el crecimiento de este microorganismo. El tratamiento térmico (80°C por 10min), previo a la inoculación en el medio, eliminó las células vegetativas de los microorganismos presentes en la muestra INCÓGNITA. Las únicas unidades formadoras de colonias que se espera hayan crecido son endosporas, y en la incógnita el único microorganismo capaz de formar endosporas es *Bacillus*. Una excepción sería la contaminación con células vegetativas de bacterias termófilas, pero estos organismos no crecerían ni producirían colonias bajo estas condiciones de incubación (Lindquist, 2005). Al finalizar el protocolo se obtuvieron colonias de contorno irregular, blancas en los bordes y centros color crema que se elevan sobre la superficie del medio (Figura 3).



Figura 3. Crecimiento de colonias del género *Bacillus* asiladas en agar RT.

2.3. *Pseudomonas* spp.

Exactamente 24h después de la inoculación se observaron UFC sobre el medio Mc Conkey; sin embargo no se obtuvieron colonias color blanco transparentes, sino en su mayoría eran color rosadas de distintos tonos (Figura. 4). Aún así, a partir de estas colonias aisladas se realizó el repique en agar Cetrimide. La selección por color se debe a la capacidad del medio de cultivo Mc Conkey de diferenciar las bacterias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras como *Pseudomonas* sp., las cuales carecen de la enzima necesaria para utilizar la lactosa (Callicó *et al.*, 2004). Las bacterias no fermentadoras de lactosa utilizan la peptona para su desarrollo, esto produce amoníaco que eleva el pH del agar, y conduce a la formación de las colonias blancas/descoloridas.

Por otro lado, el tinte rojo neutral colorea bacterias que fermentan la lactosa (Lac+), mostrándose color rosa (Merck, 2002). Las colonias rosas transferidas a medio Cetrimide no crecieron al cabo de la incubación. Al realizarse el Api20E el resultado apunta hacia 4 215 773, código que según el manual corresponde a *Klebsiella planticola* o *Klebsiella pneum. Pneumoniae* (Figura 5). Debido a que inicialmente no se logró aislar bacterias *Pseudomonas*, no se emplearon para los análisis de fermentación.

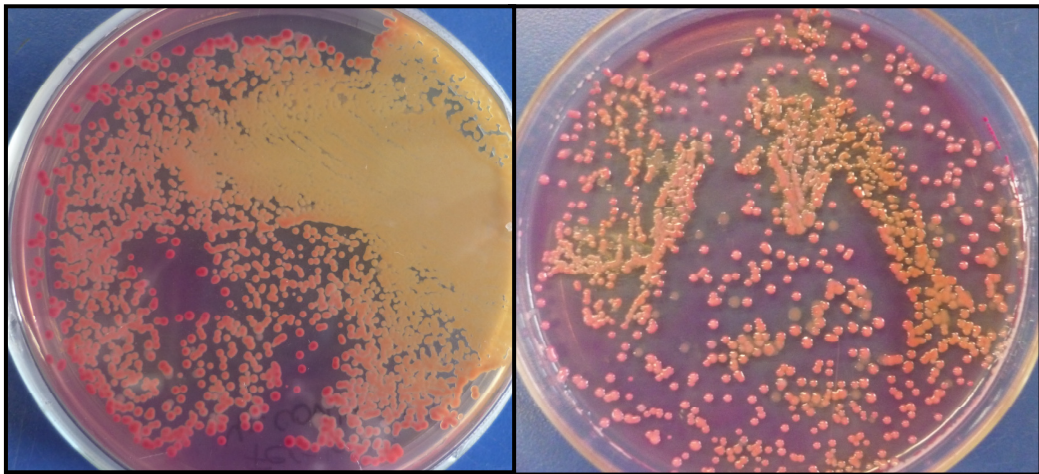


Figura 4. Crecimiento en Mc Conkey de bacterias presentes en INCÓGNITA.

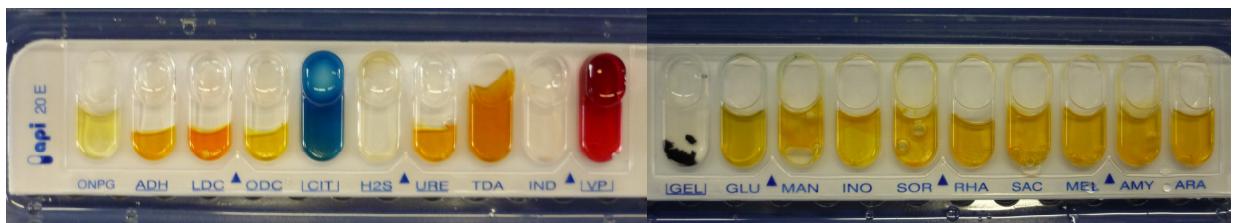


Figura 5. Resultados del Api20E para colonias en McConkey.

Se evaluó el crecimiento de la INCÓGNITA directamente en agar Cetrimide, lo cual produjo, al cabo de 3 días de incubación, colonias color blanco con halos verde fluorescente (Figura 6). Esta nueva prueba se realizó en vista de que la anterior metodología no produjo resultados positivos. El agar Cetrimide cumple una función diferencial, ya que al poseer cetrimide (cetiltrimetilbromuro de amonio) inhibe aquellas bacterias diferentes de *Pseudomonas*, y es especialmente efectivo para *P.aeruginosa*. Explícitamente, su efecto como detergente catiónico, amonio cuaternario, causa que se libere el fósforo y nitrógeno de las membranas bacterianas (Whatman, 2007). A partir de un cultivo joven (24h) se realizó también un Api20E para su identificación (Figura 7). El código obtenido fue el 0 224 044 lo cual, según el manual, no corresponde a ningún microorganismo. Los cuatro primeros números del código conciernen a las pruebas bioquímicas, y usualmente son más precisas para la identificación. Las lecturas de las reacciones con los azúcares, posteriores tres dígitos, pueden

variar debido a mutaciones que sufran los microorganismos al transferirse de un medio a otro continuamente. Los códigos 0 224 000, 0 224 020, 0 224 200 y 0 224 220 identifican al microorganismo *Providencia stuartii*.

A pesar de obtener un resultado inesperado, existen altas probabilidades que éste sea incorrecto debido a múltiples fuentes de error. Los reactivos empleados no son nuevos y han sido utilizados por muchos otros investigadores, lo cual implica una alta probabilidad de mala manipulación. Éstos son sumamente sensibles a altas temperaturas y deben mantenerse en refrigeración continua. Además debe considerarse el factor humano el cual puede provocar errores en la lectura de los resultados. Si se considera que la identificación de colores muy semejantes entre sí como amarillo, anaranjado, rosado, rojo, entre otros, dificultan las lecturas; se manifiesta el alto porcentaje de probabilidad de error que esta técnica arrastra. La lectura de colores es altamente subjetiva, por lo que se reduce la confianza en los resultados de la técnica.

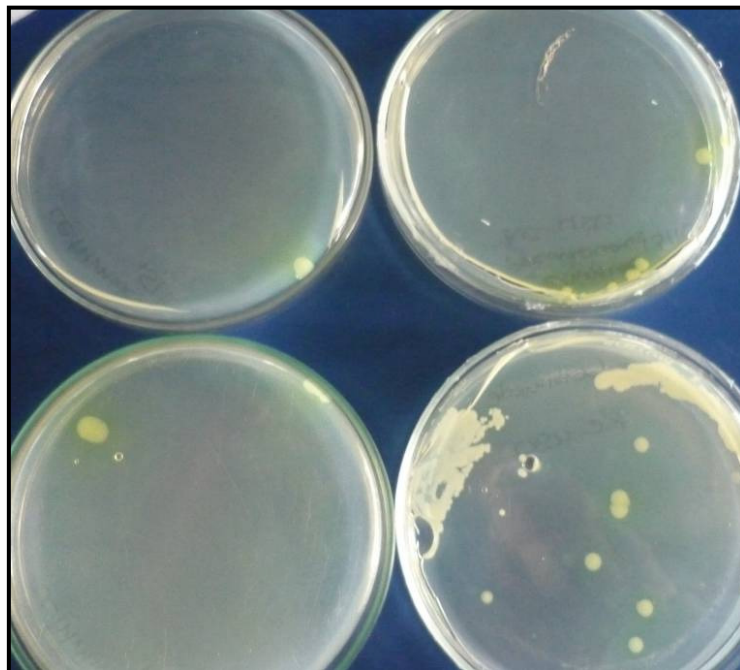


Figura 6. Crecimiento de bacterias en medio Cetrimide de la muestra INCÓGNITA.



Figura 7. Resultados del Api20E para colonias en Cetrimide.

2.4. Tinción diferencial de Gram

La tinción diferencial de Gram toma como referencia el tipo de pared celular de cada bacteria, ya que dependiendo de ésta pueden ser Gram positivas (+) o Gram negativas (-). Estas dos clases de células bacterianas se observan muy distintas luego de la tinción Gram, y esto ha sido una base estándar para comenzar la identificación de diversas especies bacterianas (CNBA, 1997; Paustian y Roberts, 2006). Luego de la tinción se lograron observar las bacterias al microscopio de manera clara, y se procedió a clasificarlas según morfología y tinción. La metodología de la tinción es imprescindible que se realice cumpliendo con cada uno de los pasos descritos en el orden estipulado (Anexo 1), pues de lo contrario, no se lograría aprovechar la herramienta, y podría generar resultados falsos o ninguno en general.

El aislamiento en medio Mc Conkey mostró bacilos relativamente pequeños con una coloración rojiza, es decir gram negativos; sin embargo por la coloración rosa de las colonias se descarta la posibilidad de que estos microorganismos pertenezcan al género *Pseudomonas*. El cultivo gram negativo de *Azotobacter* se distinguió además por el tamaño relativamente grande de sus bacilos. Finalmente se observaron los bacilos gram positivos color morado del género *Bacillus* (Figura 8).

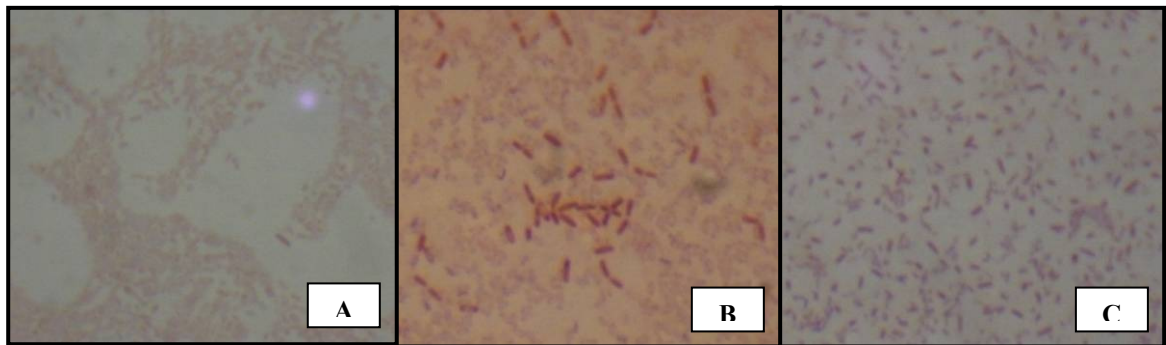


Figura 8. Tinción gram de los cultivos aislados observados al microscopio (100x). A: Bacilo gram negativo B: *Azotobacter* C: *Bacillus*.

3. Fermentaciones

En esta fermentación tipo batch o discontinua, se añadió una solución rica en nutrientes, correspondiente a una disolución de melaza, y se inocularon los microorganismos. Las condiciones en este tipo de fermentación varían por la acumulación de productos de desecho y la multiplicación de los microorganismos. A su vez, el comportamiento de los microorganismos en crecimiento es resultado de la interacción que se produce entre éstos y el medio ambiente, y que en rigor es la derivación de los llamados efectores intra y extra celulares. Los efectores internos están representados por la dotación genética intrínseca del organismo y por sus mecanismos de regulación metabólica; que en este caso no fueron manejados o alterados de ninguna manera. Por otro lado, en el ensayo se ejerció control de la temperatura y agitación durante la fermentación, y previo a ésta se ajustó el pH del medio; todos estos aspectos corresponden a efectores externos; constituidos por las variables de naturaleza física y química (Ertola *et al.*, 1994).

3.1. Inóculo

El inóculo para las fermentaciones de la investigación se preparó a partir de cultivos jóvenes, asegurando de esta manera una respuesta rápida de crecimiento y pureza. Este material microbiológico constituye el punto de partida para el escalado, incluyendo la fase de laboratorio como es el caso (Ertola *et al.*, 1994).

3.2. Evaluación de la concentración de melaza

La metodología describe la formulación de los caldos empleados para la fermentación, preparados a partir de melaza producida en el ingenio de Azucarera El Viejo. Basado en el crecimiento observado, se puede asegurar que el medio de fermentación poseía los componentes necesarios para lograr el crecimiento bacteriano y por ende biomasa, que es el producto de interés. Para esto se consideraron todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados (Ertola *et al.*, 1994).

En primera instancia, como se mencionó en la revisión de literatura, los microorganismos blanco son versátiles quimioheterótrofos, por lo cual se estimaba su capacidad para emplear la melaza como fuente nutricional. Segundo, la melaza, aunque constituida principalmente por sacarosa, debe considerarse que su composición varía según el manejo de la caña de azúcar. Por esta razón se empleó melaza producida en la empresa; lo que además la convierte en una fuente barata y accesible. En tercera instancia tenemos la evaluación de los eventos que se dan de manera general en un proceso de fermentación. En estos sistemas de cultivo cerrados, el crecimiento bacteriano típico consiste en cuatro fases: lag, exponencial, estacionaria y muerte.

Existieron dos factores que permitieron reducir considerablemente el tiempo de adaptación (fase lag), el cual no se logró detectar; el medio empleado, que era muy rico; y la bondad del inóculo, ya que las bacterias se encontraban en

crecimiento exponencial, es decir, activas metabólicamente. Por otro lado, durante la fase exponencial los caldos se volvían más espesos y la biomasa producía un cambio en la coloración del caldo. Esta característica cualitativa se intenta demostrar mediante la técnica de conteo en placa, para la determinación de las concentraciones celulares en cada fermentación. Al finalizar esta fase se entra a la fase estacionaria; sin embargo, esta fase tampoco se logró observar en el ensayo. La fase estacionaria se debe a que se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. Este último caso se evidenciaría como contaminación, posibilidad eliminada debido a la asepsia con la que se trabajó y los resultados de la muestra control (Guzmán *et al.*, 2005; Iáñez, 2005).

Para detectar y medir el crecimiento microbiano existen muchos métodos, en el estudio sin embargo, se empleó el conteo en placas. Éste presupone que cada colonia proviene de un microorganismo en la muestra, lo cual asegura la viabilidad de los microorganismos contados. Por la cualidad anterior, esta técnica permitiría, en buena teoría, detectar la fase estacionaria y de lisis celular. Para el conteo se deben seleccionar aquellas placas donde aparezca de 30 a 300 unidades formadoras de colonia (UFC), pues de esta manera se reduce el error en el conteo; pero se calculó que había más de trescientas, por lo cual se procedió a dividir la placa en cuartos o dieciseisavos según fue necesario (Shirai, s.f.). Aunque se realizaron diluciones de las muestras tomadas, en muchos casos se presentaron colonias esparcidas que impidieron el cálculo de la concentración. Este tipo de crecimiento en placa, mostrado por ambos géneros de bacteria, obstaculizó seriamente la lectura de los resultados; y por ende imposibilitó la graficación de las curvas de crecimiento (Anexo 3).

Bacillus

Si se compara la concentración celular de *Bacillus* en medios con melaza al 5, 10 y 15% p/v, se observa que a las 32h en melaza al 10% p/v se presentó la

mayor concentración de bacterias de todo el ensayo, con un total de $5,1 \times 10^8$ células/mL (Cuadro 4). Por consiguiente, se podría considerar que esta es la fermentación recomendada para el organismo. También cabe mencionar que si se compara la concentración obtenida con la presente en la INCÓGNITA, se puede decir que es una concentración aceptable para uso en bio-fertilizantes.

Pero por otro lado, al analizar los conteos dentro de la variable del tiempo, se observa que *Bacillus* en melaza al 5% p/v alcanza la máxima concentración a las 24h, mientras que en melaza al 10% p/v a las 32h. Lo que procedería es determinar si la concentración de $5,1 \times 10^8$ es significativamente mayor que $4,3 \times 10^7$ y comparar el costo/beneficio de cada opción; para así poder seleccionar la mejor.

Bacillus en melaza al 15% p/v aparenta mantenerse en crecimiento exponencial a las 48h, ya que en lugar de disminuir, como en los casos de menor concentración de melaza, se muestra un aumento en la concentración. Esto se debe probablemente a que la fermentación aún posee suficiente sustrato disponible. Caso contrario en la fermentación con melaza al 5% p/v, la cual nunca alcanza concentraciones tan elevadas de bacterias debido a que el sustrato es consumido rápidamente. A las 48h, la concentración obtenida en melaza al 15% p/v de $3,4 \times 10^8$ es menor que las $5,1 \times 10^8$ células/mL derivadas de la fermentación en melaza al 10% p/v a las 32h. Cabe entonces la posibilidad que la fase lag se vea aumentada a concentraciones elevadas de melaza en el caldo; lo cual, a su vez, implica que es posible que la concentración máxima en melaza al 15%, en algún momento, llegue a ser mayor; pero tomaría más tiempo de incubación.

Así mismo, es importante subrayar que el crecimiento alcanzado en medio líquido a base de melaza, cualquiera de las concentraciones, es mayor si se le compara contemporáneamente con los conteos en caldo tripticasa soya (Cuadro 4). Demostrando, de esta manera, ser un sustrato más rico y efectivo para fermentaciones de *Bacillus*.

Cuadro 4. Determinación del crecimiento celular de *Bacillus* spp. en medio líquido a base de melaza al 5, 10 y 15% p/v.

Muestra	Tiempo (h)	UFC/mL
5% p/v	8	-
5% p/v	24	$4,3 \times 10^7$
5% p/v	32	$3,3 \times 10^8$
5% p/v	48	$2,2 \times 10^8$
10% p/v	8	-
10% p/v	24	$3,4 \times 10^7$
10% p/v	32	$5,1 \times 10^8$
10% p/v	48	$2,0 \times 10^8$
15% p/v	8	-
15% p/v	24	-
15% p/v	32	$2,4 \times 10^8$
15% p/v	48	$3,4 \times 10^8$

Azotobacter

El crecimiento en placa de este microorganismo resultó no ser el esperado; ya que en la gran mayoría de los casos no presentó UFC, sino una sola colonia esparcidora. Cuando fue posible realizar conteos, como a las 32h de fermentación, se evidenció que el crecimiento celular es mayor que el de *Bacillus*, alcanzando concentraciones de hasta $6,0 \times 10^8$ células/mL (Cuadro 5). Ésta se observó en la fermentación con melaza al 5% p/v, lo cual también es importante mencionar. Aparentemente, el uso de la melaza como sustrato es más efectivo comparado con *Bacillus*; pero mostró aún mayor concentración en el fermento con caldo tripticasa y soya. Aún así, las concentraciones obtenidas son comparables también con las empleadas en el bio-fertilizante comercial.

Cuadro 5. Determinación del crecimiento celular de *Azotobacter* spp. en medio líquido a base de melaza a tres concentraciones.

Muestra	Tiempo (h)	UFC/mL
5% p/v	8	
5% p/v	24	1,9 x10 ⁷
5% p/v	32	6,0 x10 ⁸
5% p/v	48	
10% p/v	8	
10% p/v	24	
10% p/v	32	4,4 x10 ⁸
10% p/v	48	
15% p/v	8	
15% p/v	24	
15% p/v	32	5,2 x10 ⁸
15% p/v	48	

Cuadro 6. Determinación del crecimiento celular de *Bacillus* sp. y *Azotobacter* sp. en caldo tripticasa soya.

Muestra	Tiempo (h)	cel/mL
<i>Bacillus</i> sp.	8	
	24	1,8 x10 ⁷
	32	7,5 x10 ⁷
	48	1,9 x10 ⁸
<i>Azotobacter</i> sp.	8	
	24	
	32	7,0 x10 ⁸
	48	

El crecimiento en placas de las muestras tomadas de la fermentación control fue nulo, como se demuestra en la Figura 8. Este resultado permite asegurar que durante todo el protocolo se trabajó asépticamente.

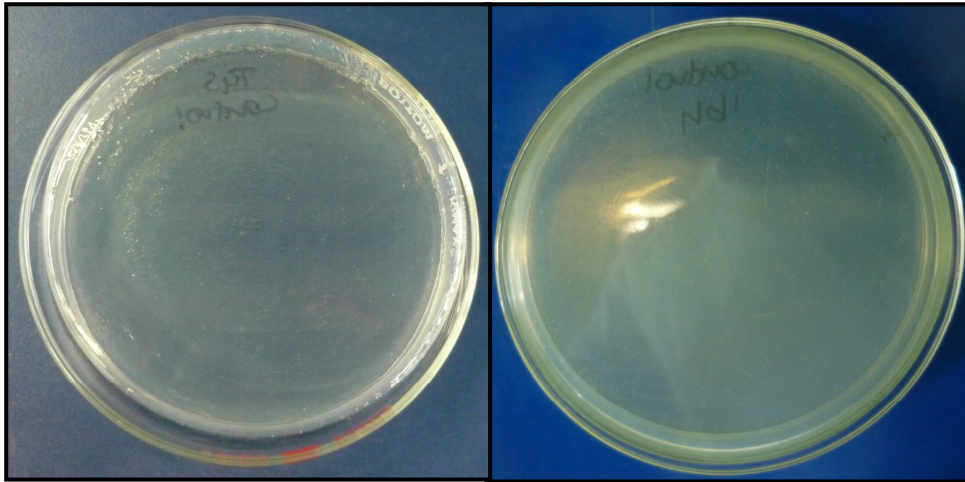


Figura 9. Control de fermentación.

CONCLUSIONES

A grandes rasgos se puede concluir que a partir de la INCÓGNITA es posible aislar al menos dos de los tres géneros de bacteria deseados; sin embargo puede contemplarse emplear un protocolo que permita identificar la especie de las bacterias blanco, fijadoras de nitrógeno, con las que se está trabajando. Por otro lado, la melaza es un sustrato eficiente para la fermentación de las bacterias asiladas de interés. No solo suple los requisitos nutricionales, sino que el crecimiento en ésta es comparable con el crecimiento mostrado en el caldo tripticasa soya. Además, se observó poca diferencia en la concentración celular obtenida en las fermentaciones con melaza al 5, 10 y 15%; lo que corresponde a continuación es determinar si es significativo o no. Con base en los resultados obtenidos, se considera que es suficiente emplear medio de melaza al 5% con 32h de incubación, debido a que las concentraciones alcanzadas son comparables con los empleados en productos comerciales.

Finalmente, a pesar de las vicisitudes adversas que impidieron obtener una curva de crecimiento clara, se definió una línea base sobre la cual se puede continuar trabajando, hasta alcanzar grandes avances y logros en la materia.

RECOMENDACIONES

Gracias a la experiencia adquirida a partir de este ensayo es que se plantean las siguientes recomendaciones. En primera instancia, si a partir de la muestra IINCÓGNITA no fue posible aislar bacterias del género *Pseudomonas*, debe considerarse el aislamiento a partir de muestras de suelo. Esto conlleva ventajas adicionales si se toma en cuenta que el microorganismo aislado se encuentra adaptado a vivir bajo las condiciones en que se desea aplicar mediante la biofertilización; sin embargo requiere de metodologías de aislamiento e identificación distintas.

En cuanto a la técnica empleada para la determinación del crecimiento microbiano, se recomienda optimizar el protocolo, pues no proporcionó mucha exactitud a los cálculos. Es necesario aumentar las diluciones para facilitar los conteos; sin embargo, si el crecimiento en placa continúa siendo de células esparcidas, debe considerarse emplear un método distinto. Además, debe reducirse el tiempo entre muestreos, para poder apreciar claramente el comportamiento de los microorganismos y graficar la curva de crecimiento. Finalmente, debe tomarse en cuenta el análisis estadístico dentro de la metodología del experimento, para poder obtener resultados más confiables.

Referencias Bibliográficas

- ACUÑA, G. 2004. La Agroindustria de la Caña de Azúcar en Costa Rica: Características, Organización y Condiciones Laborales. Asociación Servicios de Promoción Laboral.
- ACUÑA, O. 2006. La fijación biológica de nitrógeno: El caso de la caña de azúcar. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. pp 662-665.
- ALLAN, D. y GRAHAM, P. 2002. Soil 5611: Soil Biology and Fertility: Symbiotic Nitrogen Fixation, other N₂-fixing symbiosis. Dep. of Soil, Water, and Climate. University of Minnesota. <<http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogenFixation/Other.htm>> (15/11/2007).
- ARAUZ, F. 1997. Hacia un uso racional de los plaguicidas sintéticos: Una perspectiva Agroecológica. *Agronomía Costarricense* 21(1):19-23.
- BARQUERO, M. 2006. Alza en azúcar devuelve fe a miles de productores. *Economía. La Nación*. Febrero 13. San José, Costa Rica. <http://www.nacion.com/ln_ee/2006/febrero/13/economia1.html> (19/06/2007).
- BIAGRO SA. s.f. Microorganismos benéficos para la agricultura. Departamento Técnico de Laboratorios Biagro SA. <<http://www.planetasoja.com/trabajos/trabajos800.php?id1=3311&idSec=26&publi=1>> (20/11/2007).
- BIFANI P. 1999. Medio ambiente y desarrollo sostenible. 4^o Edición. Editorial Instituto de Estudios Políticos para América Latina y África (IEPALA). Madrid, España.
- CALLICÓ, A.; CEDRÉ, B.; SIFONTES, S.; TORRES, V.; PINO, Y.; CALLÍS, A.H. y ESNARD, S. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Instituto Finlay. *VacciMonitor* 2 Año 13 No. 3 Julio-Septiembre del 2004. Ciudad de La Habana. Cuba.
- CÁMARA NACIONAL DE AGRICULTURA Y AGROINDUSTRIA (CNAA). 2009. Noticias de la Prensa Nacional. Boletín Informativo. Del 19-31 de enero del 2009. N° 2-2009. 3pp.
- CHAVES, M. 1999. Nutrición y Fertilización de la caña de azúcar en Costa Rica. Conferencia 78. III Congreso Nacional de Suelos. XI Congreso Nacional Agronómico. pp 193-214. <http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_XI/a50-6907-III_193.pdf> (17/10/2007).
- CHAVES, M. 2006. Comportamiento del sector azucarero costarricense durante el periodo 2000/2005. Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Centro América (XVI, San José, Costa Rica). Memoria Toma 1. Agosto 2006. p.3-14.
- CHEN J., TANNAHILL A. L., y SHULER M. L. 1985. Design of a system for the control of low dissolved oxygen concentrations: Critical oxygen concentrations for *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 127(2):151–155. Publicado en línea: 18 Feb 2004. <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/107620919/ABSTRACT>> (10/11/2007).
- COLEGIO NACIONAL DE BUENOS AIRES (CNBA). 1997. Las bacterias ¿cómo clasificarlas? T.P. No.2. Bacterias. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. <<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Trabprac/Tp2/tp2.html>> (10/10/2007).
- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC). 2004. Primer chip de ADN que incluye todos los genes de una bacteria desarrollado de forma íntegra en España. Lunes 31 de Mayo. noticia n° 25.295.

- <http://www.noticias.info/Archivo/2004/200405/20040531/20040531_25295.shtm> (06/12/2007).
- CORVERA, A. 2000. La fijación biológica de nitrógeno y su importancia. La ciencia en todas partes. Revista Red Escolar Año 2 N° 6 julio-septiembre del 2000. <<http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/Revista/06/articulos/06.html>> (20/06/2007).
- CURTIN, L. 1983. Molasses- General Considerations. National Feed Ingredients Association. West Des Moines, Iowa. 11 p. <<http://rcrec-ona.ifas.ufl.edu/mol.pdf>> (20/11/2007).
- DESNOUES, N.; LIN, M.; GUO, X.; MA, L.; CARREÑO, R. y ELMERICH, C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. Microbiology 149 (2003), 2251-2262. DOI 10.1099/mic.0.26270-0
- DILUCCIO, R. y KIRWAN, D. 1983. Effect of dissolved oxygen on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii*. I. Free cell cultures. Biotechnology and Bioengineering 26(1):81–86. Published Online: 18 Feb 2004. <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/107620906/ABSTRACT>>
- ERAZO, J.P. s.f. Propuesta para la aplicación de microorganismos promotores de la descomposición de los residuos de cosecha y promotores del crecimiento vegetal en caña de azúcar. Agricultura Orgánica. Palmira, Colombia. <http://www.controlbiologico.com/propuesta_cana.htm> (20/06/2007).
- ERTOLA, R.; YANTORNO, O. y MIGNONE, C. 1994. Microbiología Industrial. p 107. <http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/mbio_ind.htm> (10/10/2007).
- ESPÍN, G. s.f. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. <www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf> (10/12/2007).
- FAJARDO E. y SARMIENTO S. 2007. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 120p <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>> (15/08/2008).
- GUZMÁN, J.; MENA, K.; SHUPAN, H. y REYNOSA, K. 2005. Modelo matemático del crecimiento de bacterias. Facultad de Química y Farmacia. Universidad del Salvador. El Salvador.
- HANDELSMAN, J. y STABB, E. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. The Plant Cell. Vol.8. p 1855-1863.
- HATAYAMA, K.; KAWAI, S.; SHOUN, H.; UEDA, Y. y NAKAMURA, A. 2005. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005 (Vol. 55) (No. 4) 1539-1544.
- HORNICK, L.; PETERS, L y HUGENHOLTZ, P. 2007. *Azotobacter vinelandii*. Tree of Life. Bacteria. Proteobacteri. University of California. <http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/azovi/azovi.home.html> (19/9/07).
- IÁÑEZ, P.E. 2005. Microbiología General. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. España. <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12_crecimiento.htm> (10/09/2007).
- INTERNACIONAL BIOTECHNOLOGY ORGANIZATION (IBO). 2007. HAB®. Guayaquil, Ecuador. <<http://www.ibosa.org/hab.html>> (29/11/2007).
- KASS, D. 1996. Fertilidad de Suelos. Primera Edición. Editorial UNED. 233p. San José, Costa Rica.
- KROTZKY A. y WERNER. D. 1987. Nitrogen fixation in *Pseudomonas stutzeri*. Archives of Microbiology 147:1 pp: 48-57. DOI 10.1007/BF00492904.

- LEE, S.; FLORES-ENCARNACIÓN, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J.E. y KENNEDY, C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.* 186(16):5384-5391.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. y PARKER, J. 2004. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª Edición. Pearson Prentice Hall. Madrid, España.
- MALLOLAS, J. y VILA, J. 2002. Infecciones causadas por *Pseudomonas* y otros bacilos gram negativos no fermentadores. Revisiones y actualizaciones: Enfermedades infecciosas. *MEDICINE*. Lunes 18 Febrero. 8(64):3398 – 3407.
- MARTIN, F. y LOPER, J. 1999. Soilborne Plant Disease Caused by *Phytophthora* spp.: Ecology, Epidemiology, and Prospects for Biological Control. *Critical Reviews in Plant Science* 18(2): 111-181.
- MAYZ-FIGUEROA J. 2004. Biological Nitrogen Fixation. *Revista Científica UDO Agrícola*. 4(1):1-20. Universidad de Oriente Press. ISSN: 1317-9152.
- MERCK. 2002. Agar Cetrimide – Agar Mc Conkey. Microbiología. Darmstadt, Germany. <http://service.merck.de/microbiology/tedisdata/prods/4984-1_05284_0500.html> (07/09/2007).
- MING-MUH KAO y TE-SHANG HSIEH. 1986. Studies of the Relationship between Rhizosphere Fungi and the Growth of Sugarcane. Inhibition of Sugarcane Growth by Fungal Metabolites. *Taiwan Sugar* 33:8-14.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA (MAG). S.f. Guía Técnica para el Cultivo de “Caña de Azúcar”. El Salvador. <http://www.mag.gob.sv/administrador/archivos/1/file_1172.pdf> (20/06/2007).
- MONTERO, V. 2007. Entrevista personal. CEQUIATEC, Cartago, Costa Rica.
- MOORE, P. y MARETZKI, A. 1996. Sugarcane. Photoassimilate Distribution in Plant and Crops. Marcel Dekker Inc. p 643-669. New York-Basel-Hong Kong.
- OTERO A. 2008. El hidrógeno en procesos catalíticos. Universidad de Castilla-La Mancha. España. <<http://www.uclm.es/profesorado/afantinolo/curso%20de%20catalisis/Puertollano%202007/A.Otero.doc.ppt>> (15/02/2009).
- PARSONS, R. 2004. Plant-Microbe Metabolism. <www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm> (15/11/2007).
- PAUSTIAN, T. 2006. 11-4 Nitrogen fixing bacteria. *Microbiology and Bacteriology*. <http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=274> (19/9/07).
- PAUSTIAN, T. y ROBERTS, G. 2006. 2-25 The cell wall surrounds and holds in the microbe. Chapter 2 Cell structure and organization. *Microbiology and Bacteriology. The world of microbes*. University of Wisconsin-Madison. <http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=60> (07/09/2007).
- RIVACOBÁ, R. y MORÍN, R. 2005. Caña de azúcar y sostenibilidad. Enfoques y experiencias cubanas. 2005-12-17 19:41:26. Cuba. <http://www.desal.org.mx/article.php3?id_article=26> (16/11/2007).
- ROBSON, R. L. y POSTGATE, J. R. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:183-207.
- ROJAS M.C. 2001. Bioabono de dulce encanto. U.N. Periódico. Bogotá Colombia. <http://www.biodiversityreporting.org/index.php?pageId=sub&c=Colombia&cRef=Colombia&docId=471&year=2002&lang=en_us¤tItem=article> (20/06/2007).
- SEGURA, D. y ESPÍN, G. 1998. Mutational Inactivation of a Gene Homologous to *Escherichia coli ptsP* Affects Poly- β -Hydroxybutyrate Accumulation and Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180(18):4790-4798.

- SHAWKY, B.T.; GHALI, Y.; AHMED, F.A. y KAHIL, T. 1987. Biochemical studies on the effect of various carbon sources on growth, nitrogen fixation, and main cellular constituents of *Azotobacter vinelandii*, strain IV grown under various cultivation conditions. *Acta Biotechnologica*. 7(4):361–369. Publicado en línea: 2 Feb 2004. <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/107591881/ABSTRACT.htm>>
- SHIRAI, K. S.f. Técnicas de muestreo para el control microbiológico.HACCP/Food Safety.<http://docencia.izt.uam.mx/smk/233208/material_adicional/Tecnicasmuestreo.ppt#256,1>.
- SUBIRÓS F. 1995. El cultivo de la Caña de Azúcar. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 1° Edición. 448 p. San José, Costa Rica.
- SUBIRÓS F. 1998. Respuesta de la Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*) a la Fertilización con Nitrato de Amonio en un Molisol, Guanacaste. *Agronomía Costarricense* 13(1):1-10. <www.mag.go.cr/rev_agr/v13n01_001.pdf> (20/06/2007).
- SUBIRÓS Fermín. 2009. Entrevista personal. Departamento Agrícola. Azucarera El Viejo. La Guinea, Guanacaste, Costa Rica.
- SUBIRÓS, F. y BELLO, J. 2008. Sustitución parcial de fertilizante químico nitrogenado por biofertilizante a nivel semicomercial (informe de avance, primer año). Mimeografiado. 8p.
- SUBIRÓS, F. y BELLO, J. 2008. Sustitución parcial de fertilizante químico nitrogenado por biofertilizante a nivel semicomercial (informe de avance, primer año).
- TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V. y GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosfera. *Plant and Soil* (2005) 270: 223–232. Universidad de Granada. Granada, España.
- TODAR, K. 2004. Important Groups of Prokaryotes. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. <<http://www.textbookofbacteriology.net>> (15/10/2007).
- TORRES-RUBIO, G.; VALENCIA-PLATA, S.; BERNAL-CASTILLO, J. Y MARTÍNEZ-NIETO, P. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Asociación Latinoamericana de Microbiología. Revista Latinoamericana de Microbiología* (2000) 42:171-176.
- URETA, A. y NORDLUND, S. 2002. Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. *J. Bacteriol.* 184(20):5805-5809.
- VEGA J., SIBAJA M., ALVARADO P. y DELGADO K. 2007. Uso alternativo de la melaza de la caña de azúcar residual para la síntesis de espumas rígidas de poliuretano (ERP) de uso industrial. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* vol. 22 núm. 2, 2007 101-107. <<http://www.imiq.org/documentos/251200810745.pdf>>.
- VILLALOBOS, E. 2001. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Procesos fisiológicos básicos. Fascículo I. Primera Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- WHATMAN. 2007. Agar Cetrimide. Productos. London, UK. <<http://www.whatman.com/products/?pageID=7.61.409.297>> (07/09/2007).

ANEXOS

Anexo 1. Tinción Gram

Preparación de la extensión y fijación

Inicialmente se desengrasó el porta objeto lavándolo con agua y jabón, y posteriormente se limpió con un algodón con alcohol. Luego se calentó el vidrio pasándolo tres veces sobre la llama del mechero, para eliminar restos de suciedad y grasas, de lo contrario el preparado no se podrá fijar correctamente. Para fijar la muestra se depositó una gota de agua destilada sobre el porta y se rayó una muestra de cada cultivo con un asa bacteriológica. Luego se esperó a que seicara al aire libre y finalmente se fijó al calentar la base del porta con la llama del mechero.

Tinción

En cuanto a la tinción, se realizó una vez que la muestra se enfrió. Es indispensable cumplir con los tiempos, de otro modo los colorantes no llegan a introducirse correctamente en las células.

1. El azul violeta (cristal violeta) fue el primer reactivo que se aplicó, dejándose actuar por un lapso de 1min. Esta tinción de 1min está dada para trabajar a una temperatura ambiente de 25°C. Éste es soluble en H₂O y entra en todas las bacterias tiñéndolas de violeta.
2. Se enjuagó con agua. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua no debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra.
3. Seguidamente se empleó Lugol como "mordiente" durante 1min. Siempre que se coloca un colorante o mordiente es recomendable deshacerse de los excesos de líquido ya que pueden interferir cuando se aplique otra sustancia. El lugol cristaliza al Violeta de Genciana formando un complejo insoluble en H₂O pero soluble en alcohol-acetona.
4. Posteriormente se decoloró con alcohol gota a gota. Este paso es fundamental porque en él reside la respuesta diferencial de las Gram + y

las Gram -. Sabemos que el alcohol deshidrata y contrae las células por contacto. Sabemos también que los poros de las Gram + son mas pequeños que los de las Gram -. Entonces, el alcohol contrae los poros de las bacterias cerrando completamente los de las Gram + y parcialmente los de las Gram -. El resultado es que dicha solución ingresa en estas últimas decolorándolas. Hasta aquí tenemos las Gram + violetas y cerradas y las Gram - incoloras y abiertas.

5. A continuación se cubrió con safranina durante 1min. Ésta es la tinción diferencial. El reactivo es parcialmente soluble en H₂O e ingresará sólo en las Gram - ya que las otras continúan cerradas por efecto del alcohol. Además, interactúa con la membrana celular y forma un complejo insoluble en H₂O. Esta propiedad permitió realizar el último paso que fue eliminar el exceso y lavar con H₂O (CNBA, 1997).

Anexo 2. Agar Sulfato Manitol

Para la preparación del agar sulfato manitol mezclar los componentes según se muestran en el cuadro 7 en un frasco resistente al calor, agregar 15g/L de agar, calentar hasta disolver y autoclavar a 121°C durante 15min.

Cuadro 7. Componentes del agar sulfato manitol.

REACTIVOS	CANTIDAD
Manitol	10 g
Fosfato dipotásico de hidrógeno	0,5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,2 g
Cloruro de sodio	0,2 g
Sulfato de manganeso monohidratado	trazas
Cloruro de hierro	trazas
Agua destilada	1 L

En caso de prepara caldo para fijadores de nitrógeno, únicamente prescindir del agar. En cuanto a los elementos traza, mezclar una punta de espátula en un litro de agua destilada y tomar 1mL para la preparación del medio.

Anexo 3. Imágenes del crecimiento en placa para conteo de UFC.

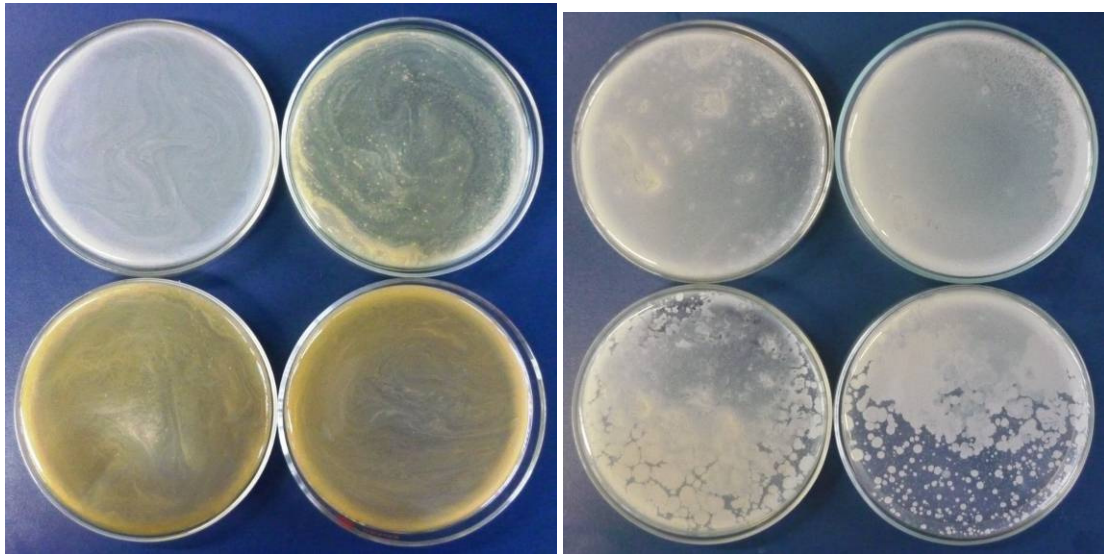


Figura 10. Crecimiento de *Bacillus* a las 8h de fermentado a partir de muestras puras (izquierda) y diluidas 10^{-2} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).

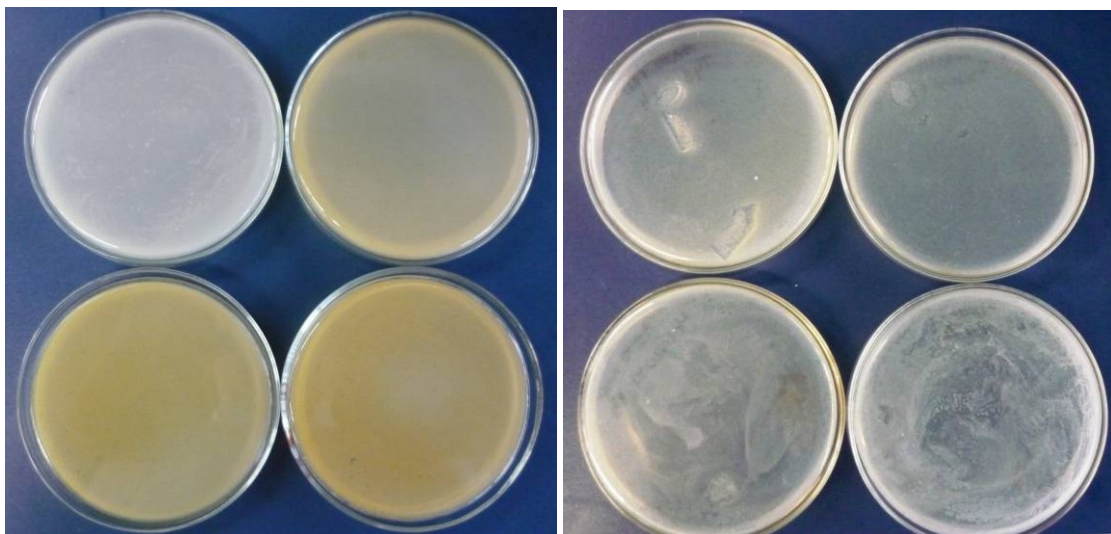


Figura 11. Crecimiento de *Azotobacter* a las 8h de fermentado a partir de muestras puras (izquierda) y diluidas 10^{-2} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).

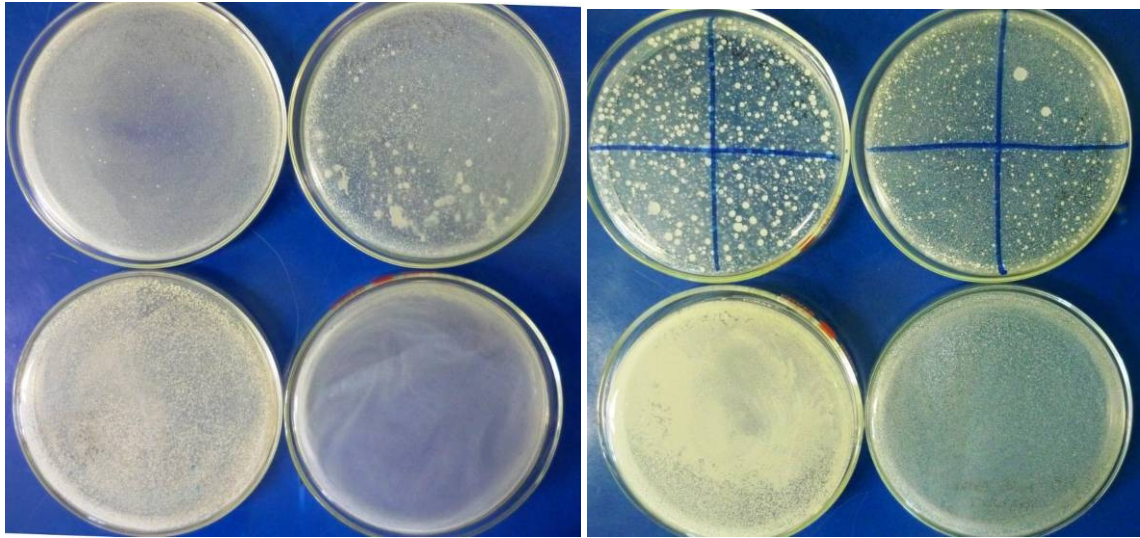


Figura 12. Crecimiento de *Bacillus* a las 24h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-2} (izquierda) y 10^{-4} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).

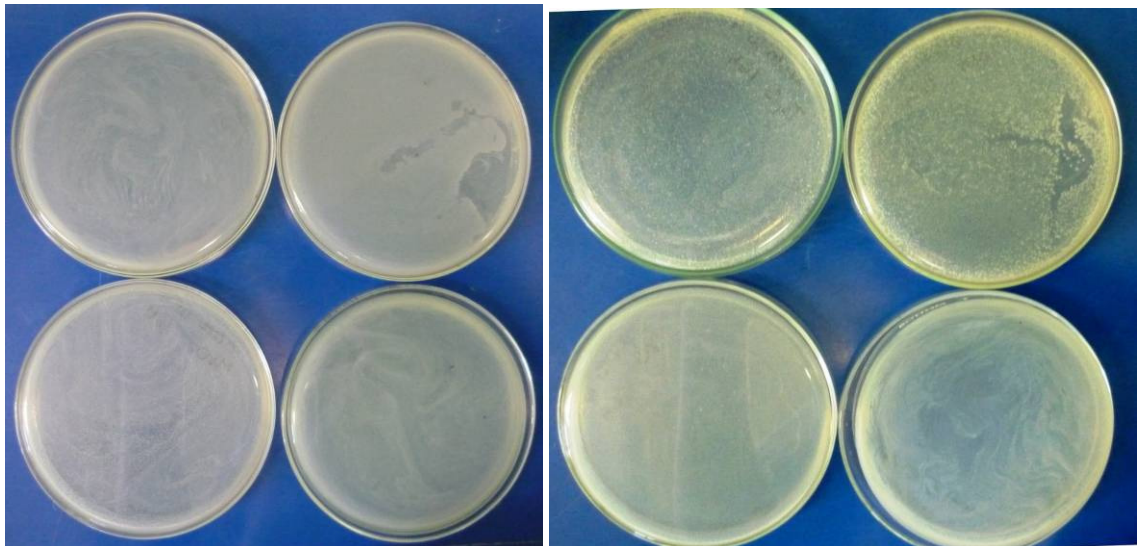


Figura 13. Crecimiento de *Azotobacter* a las 24h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-2} (izquierda) y 10^{-4} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).

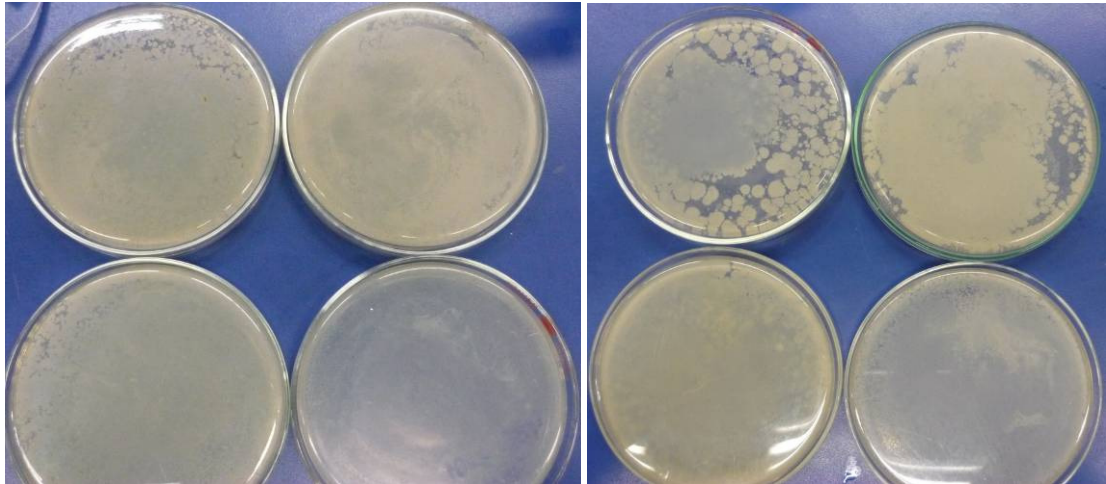


Figura 14. Crecimiento de *Bacillus* a las 32h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).

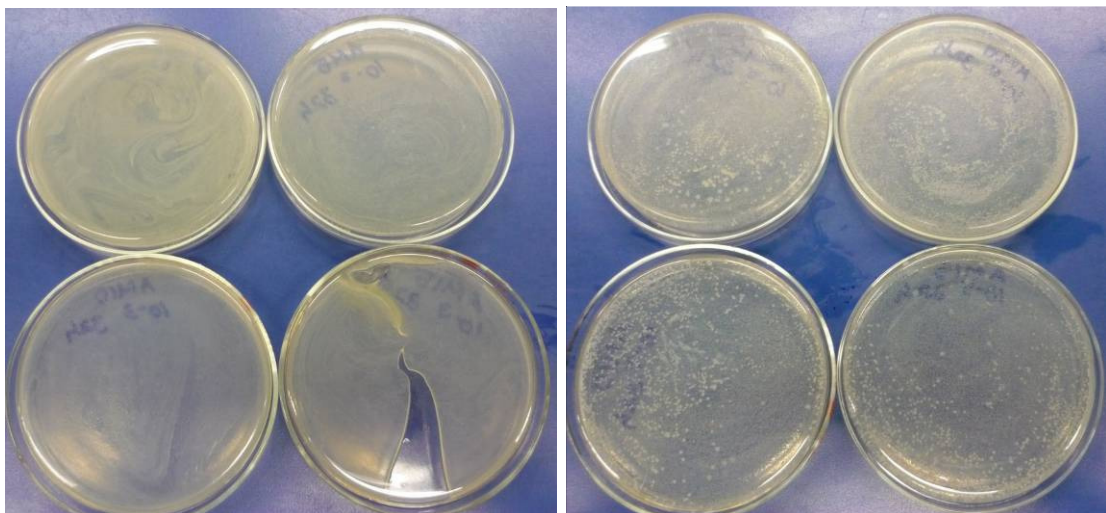


Figura 15. Crecimiento de *Azotobacter* a las 32h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).

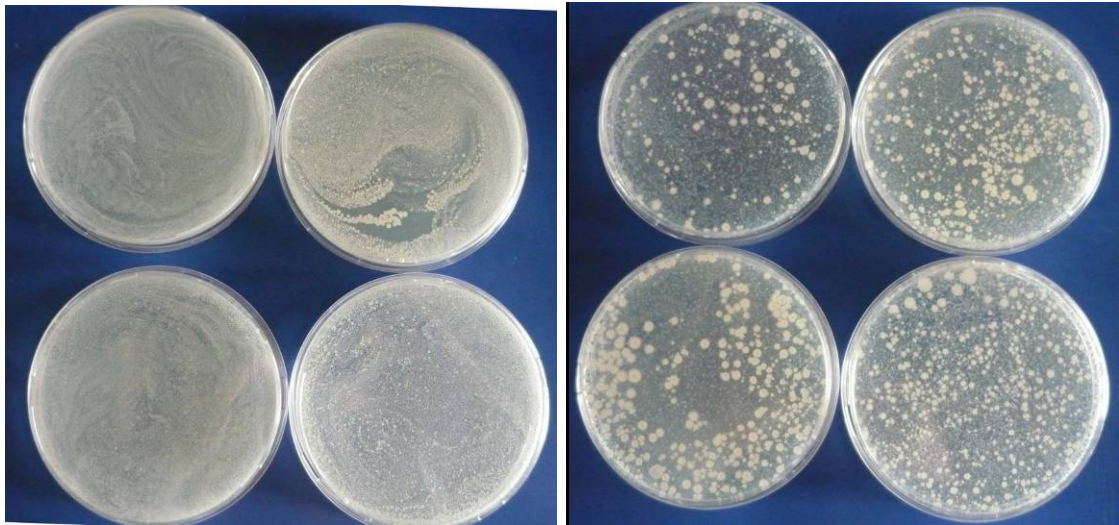


Figura 16. Crecimiento de *Bacillus* a las 48h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).

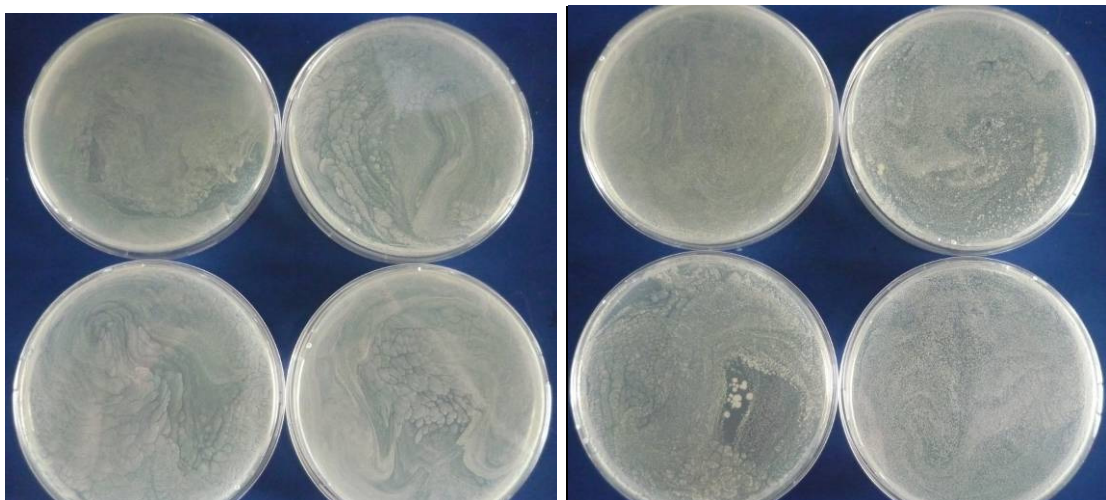


Figura 17. Crecimiento de *Azotobacter* a las 48h de fermentado a partir de muestras diluidas 10^{-3} (izquierda) y 10^{-5} (derecha). Superior: TyS (izquierda) – 5% melaza (derecha). Inferior: 10% melaza (izquierda) – 15% melaza (derecha).