



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS FIJADORES DE NITRÓGENO EN SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.**

**AURA MARÍA SALAZAR LOAIZA  
CORINA ANABEL ORDÓÑEZ GUERRERO**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2013**



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *ACTINOMICETOS* FIJADORES DE  
NITRÓGENO EN SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD  
TECNOLÓGICA DE PEREIRA.**

**AURA MARÍA SALAZAR LOAIZA  
CORINA ANABEL ORDÓÑEZ GUERRERO**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2013**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *ACTINOMICETOS* FIJADORES DE  
NITRÓGENO EN SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD  
TECNOLÓGICA DE PEREIRA.**

**AURA MARÍA SALAZAR LOAIZA  
CORINA ANABEL ORDÓÑEZ GUERRERO**

**Trabajo de grado para optar al título de Químico Industrial**

**Directora  
LILIANA BUENO LÓPEZ  
Licenciada en Biología**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PROGRAMA QUÍMICA INDUSTRIAL  
PEREIRA  
2013**

Nota de aceptación

---

---

---

---

Presidente del jurado

Jurado

---

Jurado

---

Pereira, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013

“Durante centenares de miles de años, el hombre luchó para abrirse un lugar en la naturaleza. Por primera vez en la historia de nuestra especie, la situación se ha invertido y hoy es indispensable hacerle un lugar a la naturaleza en el mundo del hombre”

**Santiago Kovadloff**

## DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado primeramente a **Dios**, motor de mi vida, el que siempre ha estado conmigo en cada paso dado, fortaleciendo mi corazón e iluminando mi vida. Gracias por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante la realización de este proyecto y en general en el transcurso de toda mi carrera. Gracias por mostrarme siempre la grandeza de tu amor y ser siempre mi fortaleza para continuar.

A mis padres, **Mónica Anabel Guerrero Moncayo** y **William Mauricio Ordóñez Moncayo** por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su esfuerzo y dedicación desmedidos, por un amor sin límites y un incondicional apoyo a lo largo de toda mi existencia. Por sus enseñanzas y buen ejemplo que se vieron siempre reflejados en el transcurso de mi vida y que afloraron más que nunca durante la realización de este trabajo. Gracias infinitas doy a Dios por haberme regalado unos Padres como ustedes, los mejores del mundo entero. Los Amo infinitamente.

A mis hermanitos **Samuel Andrés Ordóñez Guerrero** y **Esteban Mauricio Ordóñez Guerrero** por ser la razón de mi existir, la razón por la cual mi vida entera tiene un sentido. Gracias por ser el combustible que siempre me impulsa a seguir. Por estar siempre presentes en las alegrías, triunfos, angustias y dificultades, sobre todo durante la realización de este proyecto. Gracias por siempre expresarme su apoyo, comprensión y amor incondicional muchas veces sin necesidad de palabras. Los amo demasiado.

Finalmente, debo expresar un agradecimiento especial a mi compañera de tesis **Aura María Salazar** con quien trabajé de forma eficiente y animada. Gracias por haberme brindado siempre confianza, apoyo y cariño durante esta travesía que decidimos emprender juntas, gracias por darme la oportunidad de compartir esto contigo.

**Corina Anabel Ordóñez Guerrero**

## DEDICATORIA

### **A Dios**

Por brindarme la dicha de la vida, por permitirme llegar hasta este punto con salud, por llenarme de fortaleza cada día para afrontar los ires y venires, para no perder el rumbo de este camino. Por todas las enseñanzas que me han marcado en estos años. Gracias por las personas que colocaste en mi vida son los más grandes tesoros que poseo.

### **A ti madre: María del Socorro Loaiza**

Gracias primero que todo por darme la vida. Gracias por el amor que siempre me has brindado, por haberme educado. Lo que soy es gracias a todos los esfuerzos y lágrimas que has tenido que derramar. Eres mi todo, mi motor de vida, por quien lucho cada día. La carrera que hoy culmino es la semilla de la cosecha que ha de llegar para nosotras. ¡Te amo madre mía!

### **A ti padre: José Sócrates Salazar**

Gracias por darme la vida, por estar conmigo en todo momento y ser un ejemplo de constancia y esfuerzo. Gracias por siempre darme consejos con cabeza fría, a pesar de los momentos difíciles siempre has estado apoyándome, por todo esto te agradezco de corazón el que estés a mi lado.

### **A Antonio Giraldo y Fanny Giraldo**

Gracias por el amor, confianza y paz que me brindaron durante estos años. Gracias por brindarme este cariño de familia y estar atentos a lo que pase conmigo. Dios los colme de bendiciones.

### **A mi amigos Daniela Hernández y Andrés Morales**

Daniela, eres mi confidente, esa persona incondicional que sin importar el lugar o la hora está siempre ahí. Gracias por ser mi apoyo, por escucharme y brindarme un consejo cuando ya siento que no puedo más.

Andrés, no tengo como agradecerte tu apoyo y compañía no sólo conmigo sino con mi mamá. Eres con quien más he convivido durante estos últimos años, te considero como mi hermano con risas y discusiones. Siempre estarás en mi corazón

### **A mi amiga, colega y compañera de tesis: Corina Anabel Ordoñez**

Gracias por la paciencia, tolerancia y comprensión de todos estos últimos años, contigo he compartido no sólo este trabajo sino gran parte de la carrera. Gracias por tu alegría y personalidad angelical que llena de paz a quienes te rodean.

**Aura María Salazar Loaiza**



## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a:

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira por la financiación de este proyecto.

A la Escuela de Química por brindarnos los insumos químicos necesarios para el correcto desenvolvimiento del trabajo y la facilitación de los espacios de trabajo.

Al semillero de estudio **GEA** (Grupo de Estudio Agrícola) por hacernos miembros activos y brindarnos la oportunidad de ser co-autoras del primer proyecto de investigación de este semillero: 'Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación' del cual se desprende este proyecto y en el cual adquirimos experiencia tanto personal como laboral.

A nuestra directora **Liliana Bueno López**, manifestamos un inmenso agradecimiento por su orientación, colaboración, paciencia y disposición; por la confianza depositada en nosotras para el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su apoyo y amistad incondicional que nos permitió lograr un aprendizaje que trascendió lo académico.

A nuestro asesor de tesis **José Rafael Rodríguez**, gracias por la orientación y ayuda brindada; por enseñarnos lo necesario para realizar este trabajo; por sus invaluable aportes y oportunos consejos, además de ofrecernos con humildad todos sus conocimientos siempre con buena disposición, amabilidad y cariño.

A las compañeras, colegas y amigas **Luisa Castaño, Katherine Peña y Daniela Hernández**, gracias por compartir con nosotras este viaje, que como montaña

rusa tuvo altas y bajas, pero lo importante fue que estábamos juntas en un solo vagón y nuestros esfuerzos unidos lo mantenían siempre en movimiento. De cada una nos llevamos un hermoso recuerdo y el aprendizaje de que cinco diferentes formas de ser pueden formar un equipo íntegro y exitoso. Gracias por apoyarnos, brindarnos ánimo, consejo y una amistad que trascenderá por siempre en nuestras vidas. Las queremos mucho y siempre las llevaremos en el corazón.

Al equipo de apoyo de los Laboratorios de la escuela de Química en especial a **Javi** quien con mucha paciencia y amabilidad nos brindó mucha colaboración con los implementos de laboratorio requeridos. Gracias por brindarnos una sonrisa todos los días que nos alegraba siempre.

Y en general, a todo el cuerpo docente de la Escuela de Química que con su conocimiento, amabilidad y enseñanzas han contribuido a nuestra formación como grandes profesionales.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>22</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>24</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3.1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO</b>	<b>27</b>
<b>4. MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Jardín Botánico</b>	<b>28</b>
<b>4.1.1. Aspectos Generales</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP)</b>	<b>29</b>
<b>4.2.1. Generalidades</b>	<b>29</b>
<b>4.2.2. Zonificación Ambiental del Jardín Botánico</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2.1. Zona de mejoramiento ecológico-Bosque Secundario</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2.1.1. Bosque Intervenido</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2.1.2. Bosque Poco Intervenido</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2.1.3. Bosque no Intervenido</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2.2. Zona de mejoramiento ecológico-Guadual</b>	<b>31</b>
<b>4.2.2.3. Ecosistema Humedal</b>	<b>32</b>

<b>4.3.</b>	<b>Población microbiana del suelo</b>	<b>32</b>
<b>4.4.</b>	<b>Actinomicetos</b>	<b>33</b>
<b>4.4.1.</b>	<b>Conceptos Generales</b>	<b>33</b>
<b>4.4.2.</b>	<b>Aplicaciones</b>	<b>34</b>
<b>4.4.2.1.</b>	<b>Actinomicetos Fijadores de nitrógeno</b>	<b>34</b>
<b>4.4.2.1.1.</b>	<b>Streptomyces</b>	<b>34</b>
<b>4.4.2.1.2.</b>	<b>Nocardia</b>	<b>35</b>
<b>4.5.</b>	<b>Fijación de Nitrógeno</b>	<b>35</b>
<b>4.5.1.</b>	<b>Ciclo del Nitrógeno</b>	<b>36</b>
<b>4.5.1.1.</b>	<b>Fases del Ciclo</b>	<b>37</b>
<b>4.5.1.1.1.</b>	<b>Fijación</b>	<b>37</b>
<b>4.5.1.1.2.</b>	<b>Nitrificación o mineralización</b>	<b>37</b>
<b>4.5.1.1.3.</b>	<b>Asimilación</b>	<b>37</b>
<b>4.5.1.1.4.</b>	<b>Amonificación</b>	<b>38</b>
<b>4.5.1.1.5.</b>	<b>Inmovilización</b>	<b>38</b>
<b>4.5.1.1.6.</b>	<b>Desnitrificación</b>	<b>38</b>
<b>4.5.2.</b>	<b>Mecanismo Bioquímico de la Fijación de Nitrógeno</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>41</b>
<b>5.1.</b>	<b>SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>41</b>
<b>5.1.1.</b>	<b>Toma de muestra de suelo</b>	<b>41</b>

<b>5.1.2. Aislamiento y Caracterización de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno</b>	<b>43</b>
<b>5.1.2.1. Aislamiento y Cuantificación de microorganismos Fijadores de Nitrógeno en Medio Ashby</b>	<b>43</b>
<b>5.1.2.1.1. Clasificación Macroscópica y Microscópica de Cepas Aisladas en Medio Ashby</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2.1.1.1. Caracterización Macroscópica</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2.1.1.2. Caracterización Microscópica</b>	<b>45</b>
<b>5.1.2.2. Caracterización de Actinomicetos aislados por el Grupo de Estudio Agrícola (GEA) como fijadores de Nitrógeno</b>	<b>45</b>
<b>5.1.3. Identificación en Género de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno según morfología microscópica a través de Microcultivos</b>	<b>45</b>
<b>5.1.4. Confirmación del Género por medio de Caracterización Bioquímica</b>	<b>47</b>
<b>5.1.4.1. Prueba de la Oxidasa</b>	<b>47</b>
<b>5.1.4.2. Prueba de la Catalasa</b>	<b>47</b>
<b>5.1.4.3. Reducción de Nitratos</b>	<b>47</b>
<b>5.1.4.4. Hidrólisis de Urea</b>	<b>48</b>
<b>5.1.4.5. Prueba de la Caseína</b>	<b>48</b>
<b>5.1.4.6. Hidrólisis de Gelatina</b>	<b>48</b>
<b>5.1.4.7. Prueba de Citratos Simmons</b>	<b>49</b>
<b>5.1.4.8. Fermentación de Lactosa</b>	<b>49</b>

5.1.4.9. Crecimiento Anaerobio	49
5.2. Materiales y Equipos	51
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1. Localización Geográfica del muestreo	52
6.2. Aislamiento y Caracterización de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno	53
6.2.1. Aislamiento y Cuantificación de microorganismos Fijadores de Nitrógeno en Medio Ashby	53
6.2.1.1. Caracterización Macroscópica y Microscópica de Cepas Aisladas en Medio Ashby	55
6.2.2. Caracterización de Actinomicetos aislados por el Grupo de Estudio Agrícola (GEA) como Fijadores de Nitrógeno	60
6.2.3. Resultado del Aislamiento y Caracterización de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno	61
6.3. Identificación en Género de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno según morfología microscópica	62
6.3.1. Microcultivo	62
6.4. Confirmación del Género por medio de Caracterización Bioquímica	71
6.4.1. Resultados confirmación de Género	73
6.5. Evaluación <i>invitro</i> del efecto de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno sobre el desarrollo de plantas de Lechuga	77
6.5.1. Parte Experimental	77

<b>6.5.1.1. La Planta</b>	<b>77</b>
<b>6.5.1.2. Semillas</b>	<b>77</b>
<b>6.5.1.2.1. Esterilización de las Semillas</b>	<b>77</b>
<b>6.5.1.2.2. Germinación de las Semillas</b>	<b>78</b>
<b>6.5.1.3. Inóculos Bacterianos</b>	<b>79</b>
<b>6.5.1.3.1. Escala de McFarland</b>	<b>79</b>
<b>6.5.1.3.2. Preparación de los Inóculos Bacterianos</b>	<b>79</b>
<b>6.5.1.4. Ensayo Inoculación de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno en semillas germinadas de Lechuga</b>	<b>80</b>
<b>6.5.2. Resultados</b>	<b>81</b>
<b>6.5.2.1. Porcentaje Germinación de Semillas de Lechuga</b>	<b>81</b>
<b>6.5.2.2. Efecto de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno sobre el crecimiento de Lechuga</b>	<b>82</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>92</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>96</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Reporte Final UFC/g suelo del Aislamiento en Medio Ashby	<b>53</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación Macro y Microscópica de Cepas Aisladas en Medio Ashby	<b>56</b>
<b>Tabla 3.</b> Agrupaciones de las Cepas de Actinomicetos Aisladas en Medio Ashby	<b>58</b>
<b>Tabla 4.</b> Resultado de la evaluación de Actinomicetos aislados en Agar Avena como Fijadores de Nitrógeno.	<b>60</b>
<b>Tabla 5.</b> Características Microscópicas de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno y posible género	<b>62</b>
<b>Tabla 6.</b> Reporte del género de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno	<b>70</b>
<b>Tabla 7.</b> Resumen Fotográfico Pruebas Bioquímicas	<b>71</b>
<b>Tabla 8.</b> Características Bioquímicas Cepas de Referencia, (Bergey, 2005 & Dworkin, 2006)	<b>73</b>
<b>Tabla 9.</b> Resultados caracterización bioquímica de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno y comparación con resultados referencia para <i>Streptomyces sp.</i>	<b>74</b>
<b>Tabla 10.</b> Resultados caracterización bioquímica de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno y comparación con resultados referencia para <i>Nocardia sp.</i>	<b>75</b>
<b>Tabla 11.</b> Composición de la turbidez estándar de McFarland	<b>79</b>
<b>Tabla 12.</b> Resultados Porcentajes de Germinación Semillas de Lechuga	<b>81</b>
<b>Tabla 13.</b> Medida de longitud de plántulas de Lechuga crecidas bajo la influencia de Actinomicetos fijadores de Nitrógeno	<b>82</b>
<b>Tabla 14.</b> Influencia de Actinomicetos fijadores de Nitrógeno sobre plántulas le lechuga	<b>87</b>



<b>Tabla 15.</b> Resultados pruebas bioquímicas de cepas aisladas y comparación con resultados referencia para <i>Streptomyces</i> sp	<b>84</b>
<b>Tabla 16.</b> Resultados pruebas bioquímicas de cepas aisladas y comparación con resultados referencia para <i>Nocardia</i> sp	<b>85</b>
<b>Tabla 17.</b> Composición de la turbidez estándar de McFarland	<b>89</b>
<b>Tabla 18.</b> Resultados Porcentaje de Germinación Semillas de Lechuga	<b>91</b>
<b>Tabla 19.</b> Medida de longitud de plántulas de Lechuga crecidas bajo la influencia de las cepas aisladas	<b>92</b>
<b>Tabla 20.</b> Análisis POSTANOVA	<b>93</b>
<b>Tabla 21.</b> Influencia de actinomicetos fijadores de nitrógeno sobre plántulas de lechuga expresado en porcentaje de crecimiento	<b>97</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Mapa de la Zonificación Ambiental del Jardín Botánico	30
<b>Figura 2.</b> Ciclo Biogeoquímico del Nitrógeno	39
<b>Figura 3.</b> Reacción catalizada por la dinitrogenasa	40
<b>Figura 4.</b> Ecosistemas y sub-ecosistemas del JBUTP	41
<b>Figura 5.</b> Esquema general de un Cuarteo	42
<b>Figura 6.</b> Esquema del método diluciones seriadas	44
<b>Figura 7.</b> Esquema general Microcultivo	46
<b>Figura 8.</b> Cámara de Anaerobios	49
<b>Figura 9.</b> Diagrama Metodológico	50
<b>Figura 10.</b> Localización puntos de muestreo	52
<b>Figura 11.</b> Gráfica UFC/g de suelo resultantes del aislamiento en Medio Ashby	54
<b>Figura 12.</b> Montaje germinación de semillas de Lechuga desinfectadas	78
<b>Figura 13.</b> Semillas de Lechuga a 2 días de germinación	80
<b>Figura 14. Agrupaciones de Cepas según su impacto en el crecimiento de plántulas de Lechuga</b>	84
<b>Figura 15.</b> Influencia de los Actinomicetos fijadores de Nitrógeno en el crecimiento de plántulas de lechuga	85

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>ANEXO 1.</b> Medios de Cultivo	<b>96</b>
<b>ANEXO 2.</b> Reporte del conteo Unidades Formadoras de Colonia (UFC)	<b>96</b>
<b>ANEXO 3.</b> Resumen Fotográfico de las Características Macroscópicas y Microscópicas de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno	<b>99</b>
<b>ANEXO 4.</b> Evaluación <i>in-vitro</i> del efecto de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno sobre el desarrollo de plantas de Lechuga	<b>107</b>
<b>ANEXO 5.</b> Análisis Estadístico Descriptivo y ANOVA del efecto de los actinomicetos fijadores de nitrógeno en las plántulas de lechuga	<b>114</b>

## RESUMEN

El manejo inadecuado de los suelos en regiones cultivables ha intensificado los problemas de fertilidad en los mismos, debido al uso indiscriminado de fertilizantes químicos. La posibilidad de usar técnicas basadas en la manipulación de microorganismos como biofertilizantes es una alternativa que cada día cobra más interés.

Dentro de la gran variedad de microorganismos que han sido descritos como Fijadores Biológicos de Nitrógeno son de gran interés las bacterias del tipo Actinomicetos, ya que, desempeñan un papel importante en la producción de metabolitos secundarios, degradación de material orgánico y promoción del crecimiento vegetal

Considerando el gran impacto de los Actinomicetos en el suelo y al contar con un área de conservación natural en la Universidad Tecnológica de Pereira como lo es su Jardín Botánico (JBUTP), surgió el interés de realizar el aislamiento e identificación en género de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno. El Aislamiento realizado en Medio selectivo Ashby permitió la obtención de 24 Actinomicetos que poseen potencial para fijar Nitrógeno Atmosférico. La identificación en género se realizó a través de comparación morfológica de sus estructuras miceliales con las estructuras referenciadas para cada género de Actinomiceto en el Manual Taxonómico de Bergey, evidenciándose 13 cepas del género *Streptomyces* y 11 del género *Nocardia*. Para confirmar los géneros se emplearon pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, urea, gelatina, citratos, lactosa, nitratos), resultando en general una similitud de más del 70% con las características bioquímicas propias de estos géneros las cuales son reportadas en el libro *The Prokaryotes A Handbook of bacteria*.

**PALABRAS CLAVE:** Actinomicetos; Fijación de nitrógeno; Jardín Botánico UTP.

## ABSTRACT

Inadequate management of soils in arable regions has intensified fertility problems in them, due to the indiscriminate use of chemical fertilizers. The possibility of using techniques based on the manipulation of microorganisms as biofertilizers is an alternative that is becoming more interested.

Within the wide variety of microorganisms whom have been described as Biological Nitrogen fixers, are of great interest the Actinomycetes, whom play an important role in the production of secondary metabolites, degradation of organic material and plant growth promotion.

Considering the great impact of Actinomycetes in soil and taking into account the presence of a natural conservation area in the Technological University of Pereira as is Botanical Garden (JBUTP), arose the interest of making the isolation and identification until genre, of Actinomycetes Fixers nitrogen. The Isolation performed on selective medium (Ashby), allowed obtaining 24 Actinomycetes that have the potential to fix atmospheric nitrogen. The identification until genre was performed, through morphological comparison with mycelial structures referenced for each genre of actinomycete in Bergey's Manual of Taxonomic, being evidenced 13 strains of the genus *Streptomyces* and 11 strains of the genus *Nocardia*. To confirm the reported genres, were used biochemical tests (catalase, oxidase, urea, gelatin, citrates, lactose, nitrates), resulting a similarity of over 70% with the biochemical characteristics typical of these genres which are reported in the book the Procaryotes A Handbook of bacteria.

**Keywords:** Actinomycetes, Nitrogen Fixing, Botanical Garden UTP.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la forma más común de incorporar nutrientes al suelo ha sido mediante el uso de fertilizantes químicos, cuyo uso indiscriminado ha alterado significativamente los constituyentes orgánicos y vivos del suelo y con ello el equilibrio ecológico; debido a esto se han buscado alternativas agrícolas que favorezcan el desarrollo de suelos fértiles llevando a una sostenibilidad agrícola, que represente beneficios para el hombre y para el balance ecológico, (Álvarez *et al.*, 2009).

La conservación de los recursos productivos y del medio ambiente son dos exigencias básicas, en una agricultura sostenible; así, al considerar el daño ambiental que produce la aplicación exagerada y periódica de fertilizantes químicos, surge un creciente interés en usar técnicas basadas en la manipulación de microorganismos considerados para tal caso biofertilizantes, como una alternativa hacia la sustitución parcial o total de estos insumos, (Vessey, 2003).

En general, los microorganismos desarrollan en el suelo actividades relacionadas con procesos de descomposición, mineralización de complejos orgánicos y translocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan al desplazamiento de nutrientes en el ecosistema suelo-planta. Dentro de la gran diversidad de microorganismos presentes en el suelo llaman la atención los que se encuentran vinculados con la estimulación de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, ya que a través de estos se genera la movilización de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, calcio, sodio, azufre, fósforo y potasio entre los seres vivos y la atmósfera o la biomasa, (Vessey, 2003).

Uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes es el Ciclo del Nitrógeno. La abundancia de este elemento en la Atmósfera es del 78%, pero este no es aprovechado directamente por las plantas las cuales se ven obligadas a utilizar formas combinadas para asimilar Nitrógeno del suelo en cantidad suficiente para soportar los cultivos, (Cuervo, 2010).

Hoy en día la fijación biológica de Nitrógeno Atmosférico cobra más valor, dentro del contexto de la agricultura sostenible, ya que se puede evitar el uso exagerado de fertilizantes nitrogenados y contribuye a la disminución de la degradación del medio, (Arévalo, 2003).

Los microorganismos fijadores de Nitrógeno son capaces de catalizar el triple enlace de Nitrógeno y activarlo para que se combine con otros elementos químicos, como el hidrógeno o el oxígeno por medio de la enzima nitrogenasa en sus sistemas metabólicos. Algunos tipos de algas y bacterias pueden realizar este proceso biológico, entre los cuales cabe destacar a los Actinomicetos, bacterias filamentosas ampliamente distribuidas en ecosistemas naturales, (Cerdeira, 2008).

Los Actinomicetos son microorganismos Gram positivos, muy abundantes en el suelo, poseen gran importancia en el equilibrio ecológico del mismo al presentar una actividad metabólica alta, con la cual pueden desencadenar reacciones que conllevan por ejemplo, a la transformación del Nitrógeno Atmosférico molecular en Nitrógeno mineral que es asimilable por las plantas, también, producen pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal o animal, (Correa, 2000).

Considerando el gran impacto de los Actinomicetos en el suelo al poseer capacidad para Fijar Nitrógeno Atmosférico al igual que capacidad degradativa de materia orgánica y al contar con un área de conservación natural en la Universidad Tecnológica de Pereira como lo es su Jardín Botánico (JBUTP), como Químicas Industriales es uno de nuestros propósitos dar soluciones a problemas de contaminación ambiental, por lo cual, considerando el impacto negativo de fertilizantes químicos en los cultivos y el auge del uso de microorganismos como biofertilizantes, surge el interés de realizar el aislamiento e identificación hasta género de Actinomicetos presentes en el suelo del JBUTP, con el fin de determinar su potencial Fijación de Nitrógeno por medio de siembra en medio selectivo.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La historia se ha encargado de mostrar como pocas actividades humanas han permitido a los seres humanos un estrecho contacto con la naturaleza como lo ha hecho la agricultura, hasta llegar a la era moderna donde el desarrollo de las tecnologías duras de producción, entendidas como herramientas y maquinarias, incluyendo el uso excesivo de fertilizantes ha hecho que la agricultura sea cada vez mas intensiva generando mayor producción en poca extensión de terrero, (Jorgensen-Nielsen, 1996). Un reto importante en la producción agrícola mundial, es el manejo de los nutrientes del suelo, encontrando una necesidad urgente de mejorar su disponibilidad. Muchos cambios en las prácticas agrícolas como cultivos intercalados, inclusión de plantas fijadoras de Nitrógeno, la agrosilvicultura y mejora del reciclado son claramente beneficiosos, (Powlson *et al*, 2011).

El nitrógeno como factor limitante más importante en el desarrollo de las plantas, después del agua, es primordial en la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos, aminoazúcares, aminoácidos, entre otros (Olivares, 2008). El nitrato es la forma más usual tomada por la planta y puede hallarse en el suelo derivado de su contenido mineral, del incorporado de la atmósfera o de la biotransformación de moléculas orgánicas. La incorporación de Nitrógeno atmosférico al suelo es un proceso mediado generalmente por microorganismos, los cuales son los únicos seres vivos capaces de realizar esta acción y la efectúan en el marco de lo que se denomina Fijación Biológica de Nitrógeno, (Torralba – Pérez 1997).

Dentro de la gran variedad de microorganismos que han sido descritos como Fijadores Biológicos de Nitrógeno son de gran interés las bacterias del tipo Actinomicetos, que además, desempeñan un papel importante en la producción de metabolitos secundarios y la degradación de material orgánico, (Sylvia *et al*, 1999); a pesar de estas aplicaciones no se encuentra información relacionada con su existencia en los suelos del JBUTP, por lo que en esta investigación se desea abordar el estudio de los posibles Actinomicetos que se hallen en estos suelos, planteando la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira Actinomicetos que contribuyan a la Fijación Biológica de Nitrógeno siendo posible aislarlos y clasificarlos según género taxonómico?



## 2. JUSTIFICACIÓN

La Fijación de Nitrógeno por parte de microorganismos es una de las rutas más importantes para introducir de la atmósfera nitrógeno molecular a las cadenas alimentarias de la biosfera. El 78% del aire en la atmósfera es nitrógeno y en esta forma no puede ser utilizado por los organismos que denominamos superiores. Este proceso lo realizan algunos microorganismos de vida libre o asociados a los sistemas radicales que poseen el complejo enzimático nitrogenasa, (Aguirre 2009).

Aunque es un proceso biogeoquímico amplio, la Fijación Biológica de Nitrógeno se da únicamente en algunos tipos de algas cianofíceas, hongos y bacterias, destacando principalmente a los Actinomicetos. Entre las bacterias se pueden resaltar algunas especies del género *Azospirillum*, el *Rhizobium* y Actinomicetos del género *Frankia* y *Streptomyces*, entre otros, (Correa, 2000).

Los Actinomicetos son microorganismos conocidos por desarrollar diversas actividades en el ecosistema tales como crecimiento de la planta y mejoramiento del suelo, producir compuestos con actividad antagonista contra microorganismos patógenos siendo los principales productores de antibióticos y cumplir un papel importante en la descomposición de biopolímeros y compuestos recalcitrantes. Se encuentran frecuentemente en el suelo y constituyen un componente sustancial de la microbiota, registrándose hasta más de un millón de unidades formadoras de colonias en un gramo de tierra fértil, (Correa, 2000).

Hoy en día, se utilizan diferentes microorganismos con funciones específicas en la agricultura para mejorar la productividad de las plantas, entre los cuales se encuentran los Actinomicetos fijadores de Nitrógeno, los cuales son considerados fuente facilitadora del manejo de los nutrimentos que benefician el funcionamiento de los cultivos, formando parte de una tecnología que garantiza una productividad biológica, económica y ecológica más exitosa y sin contaminación del ambiente, (Aguirre 2009), estimulando así la producción de biofertilizantes, tecnología clave para asegurar la sustentabilidad y productividad en el sector agrícola, (Correa, 2000).

El Jardín Botánico ha logrado a lo largo de sus años, consolidarse como uno de los principales proveedores de material vegetal para procesos de reforestación,

re poblamiento y restauración ecológica. Gracias a esto, se ha explorado en gran medida la inmensa cantidad de especies de flora y fauna presentes, logrando un avance significativo en cuanto a organización, desarrollo e investigación, (JBUTP Centro de Recursos Informáticos).

La mayoría de trabajos realizados en el JBUTP, hacen relación a Sistemas de Gestión (López y Patiño, 2002; Brito, 2005) y Educación Ambiental (Jaramillo y Londoño, 2005; Corrales y Martínez, 2006), en donde el material vegetal es el eje principal olvidándose un poco del material microbiológico presente en sus suelos, haciéndose evidente una escasez de información en cuanto a su vida microbiana, especialmente relacionada con Actinomicetos.

Por tanto, esta investigación tiene una relevancia mayor al aportar información nueva e importante relacionada con la diversidad microbiana presente en estos suelos, abriendo las puertas a nuevas investigaciones relacionadas con su microbiota.

Debido a todo lo expresado anteriormente, se considera de gran impacto un manejo agrícola sostenible con el uso de microorganismos, surgiendo el interés de aislar del suelo del JBUTP bacterias del tipo Actinomicetos que puedan ser identificadas según género y catalogadas como posibles Fijadoras de Nitrógeno Atmosférico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Aislar e Identificar en géneros diferentes actinomicetos fijadores de Nitrógeno presentes en el suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar actinomicetos fijadores de nitrógeno del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, haciendo uso de técnicas de medio de cultivo selectivo.
- Identificar en género Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno siguiendo criterios morfológicos macro y microscópicos.

## **4. MARCO DE REFERENCIA**

### **4.1. Jardín Botánico**

#### **4.1.1. Aspectos Generales**

La conservación del ambiente desde la concepción de interacción hombre – naturaleza ha permitido comprender la magnitud de las consecuencias de aquellas acciones irresponsables en el uso de los recursos naturales, que han traído consigo pérdidas irreparables que resaltan actualmente la necesidad de generar estrategias que faciliten la existencia, permanencia y el estudio de espacios dedicados a la preservación de la biodiversidad, (Ospina. B, E. 2011).

Los jardines botánicos han jugado a lo largo de sus casi 500 años de historia un importante papel en la conservación de la flora a través de colecciones para los estudios botánicos aplicados a la medicina y farmacia en la Europa renacentista, la difusión de especies de interés económico en la época colonial o en el cultivo de plantas ornamentales en los dos últimos siglos, (BASEMAC, 2005).

El nuevo concepto de jardín botánico implicado en la conservación de las especies amenazadas, en investigación y en educación, surge en la década de 1970 y son actualmente elementos esenciales para el desarrollo sostenible y la conservación de los recursos naturales, (BASEMAC, 2005). En este contexto es necesario reconocer los jardines botánicos como centros dedicados a este fin. De los cuales actualmente existen más de 1800 en 148 países del mundo, donde se encuentran representantes de más de 80.000 especies de plantas, casi un tercio de las especies vasculares del mundo. (Organización Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos, 2000).

En Colombia el primer jardín botánico fue fundado por José Celestino Mutis en Mariquita Tolima; del cual se trasladó una pequeña parte a Bogotá pero fue destruida en 1916 por las tropas libertadoras. Finalmente en 1955, el científico Enrique Pérez Arbeláez funda el Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis que representa el inicio de la construcción de este tipo de espacios con el objetivo de conservar la fauna y flora de sus áreas de influencia en diferentes ciudades del país. (Adaptado de la página web: Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt)

La Universidad Tecnológica de Pereira inicio hace 24 años la formación de un jardín botánico por iniciativa del profesor Apolinar Sierra, mediante la siembra de flora nativa en los potreros y cafetales que habían tenido un proceso de recuperación natural alrededor del campus. En 1983 por resolución 00020 del 6 de septiembre, el Consejo Superior de la universidad creó el jardín botánico asignándole un área de 12.7 hectáreas, de las cuales se constituyen 1500 metros de senderos lineales, 10.9 hectáreas de área boscosa y 1.7 hectáreas de humedal, (Ospina. B, E. 2011).

## **4.2. Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP)**

### **4.2.1. Generalidades**

El JBUTP es un área destinada a la protección, investigación y conservación de las especies nativas del bosque andino, conformada por una zona de bosque secundario en proceso de regeneración natural en el que se han desarrollado procesos de enriquecimiento con nuevas especies y un vivero donde se encuentran las colecciones de plantas aromáticas, medicinales, orquídeas, bromelias y bambúes exóticos. (JBUTP Centro de Recursos Informáticos).

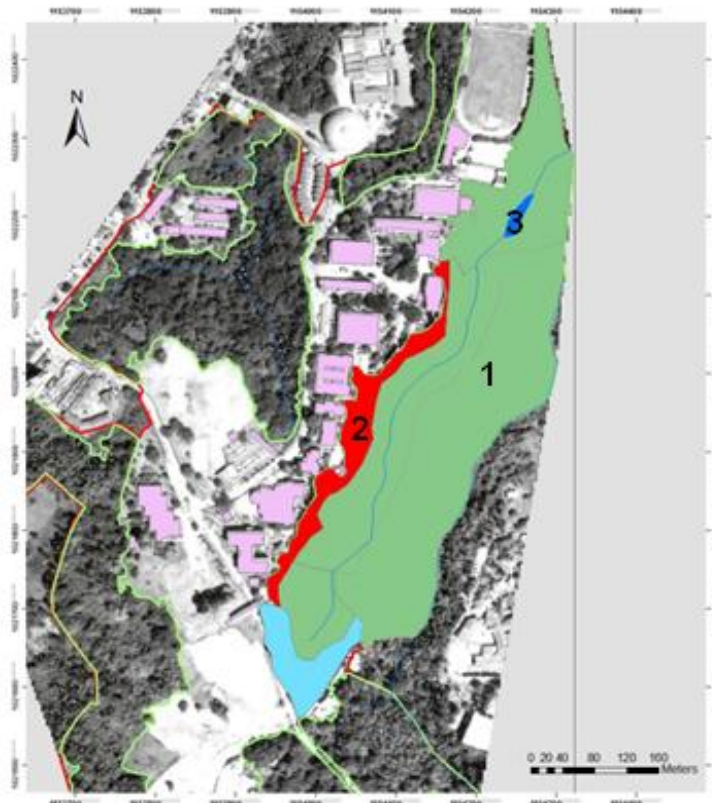
La ubicación estratégica del Jardín Botánico, por pertenecer al corredor biológico Consotá cuenta con una gran diversidad de flora y fauna asociada; así mismo el reconocimiento en el ámbito Local, Regional y Nacional ha logrado posicionar el área como un espacio importante para desarrollar procesos de conservación, investigación y educación ambiental. La importancia de los procesos de conservación de la biodiversidad del bosque andino desarrollados por el JBUTP, los cuales involucran no sólo la conservación de las especies vegetales propias de este ecosistema sino también la de algunas especies animales asociados a ellas, radica en que la región andina colombiana ha sido por muchos años la segunda mayor fuente de recursos madereros del país, por lo que muchas de las especies de flora con algún grado de amenaza se encuentran en dicha zona.(JBUTP Centro de Recursos Informáticos).

Adicionalmente, cuenta con áreas destinadas al apoyo de proyectos de investigación de las diferentes facultades y centros de investigación de la UTP, proyectos liderados por la Red Nacional de Jardines Botánicos, por el grupo de investigación Jardín Botánico Universidad Tecnológica de Pereira reconocido por

Colciencias y proyectos surgidos de diferentes convenios y alianzas. (JBUTP Centro de Recursos Informáticos).

#### **4.2.2.Zonificación Ambiental del Jardín Botánico**

En la Figura 1 se aprecia el mapa de la zonificación Ambiental del JBUTP. La zona verde demarcada con el número 1 representa el Ecosistema Bosque Secundario, la zona roja representa por el número 2 es el Ecosistema Guadual y el punto 3 representa la zona del Ecosistema Humedal. Esta información fue extraída del documento 'Plan de Manejo Ambiental' extraído de los recursos informáticos del campus.



**Figura 1. Mapa de la Zonificación Ambiental del Jardín Botánico**

##### **4.2.2.1 Zona de mejoramiento ecológico - Bosque Secundario**

El bosque secundario está dividido según la intervención humana en Bosque Intervenido, poco intervenido y no intervenido.

**4.2.2.1.1. Bosque Intervenido:** Zona que ha sufrido alteraciones en su ambiente, por causas antrópicas o naturales y en la cual es necesario implementar acciones que ayuden a mejorar las condiciones del ecosistema para garantizar la conservación de las especies de flora allí presentes y la de los objetos representativos de los servicios ambientales y culturales; a su vez, poder mantener las condiciones de hábitat adecuadas para la permanencia de las especies de fauna asociadas a este lugar.

**4.2.2.1.2. Bosque Poco Intervenido:** En esta zona se llevan a cabo algunas acciones encaminadas a mejorar las condiciones del ecosistema garantizando de esta manera la conservación de las especies que existen allí.

**4.2.2.1.3. Bosque no intervenido:** Es un bosque joven en proceso de sucesión vegetal donde se puede apreciar los diferentes estratos compuestos por gramíneas, platanillas, heliconias, helechos; diferentes especies de árboles de menor tamaño, especies trepadoras como el mata palo y algunas epifitas como bromelias y orquídeas.

#### **4.2.2.2. Zona de mejoramiento ecológico – Guadual**

La cobertura vegetal está representada por bosque de guadua angustifolia, también se observa en menor proporción especies características de la sucesión vegetal como helechos, arbustos, hierbas, trepadoras, gramíneas y epifitas. En esta área se encuentra el sendero de los Rizomas que tiene su nombre debido a las características especiales de las raíces de las guaduas, llamadas rizomas, las cuales se pueden observar a lo largo del sendero. La cobertura vegetal está representada principalmente por bosque de guadua que actúa como cobertura protectora de la microcuenca allí presente, también se encuentran otras especies menores como platanilla, heliconias, algunas epifitas y gramíneas en menor proporción. Actualmente, la guadua alcanza una altura aproximada de 20 a 30 metros y 20 centímetros de diámetro; aquí se realiza un manejo del guadual enfocado a la protección de los senderos. La quebrada asociada al bosque ingresa de forma subterránea por el límite occidental y hacia el centro del bosque de guadua, aflora generando un flujo de agua pura que alimenta el humedal.

#### **4.2.2.3. Ecosistema Humedal.**

Ubicado en la zona Norte del Jardín Botánico, tiene 2.13 ha, presenta pendientes suaves, cobertura vegetal como gramíneas, y helechos. En esta zona se encuentra el sendero del humedal. Tal como hace referencia el Grupo de Estudio en Fauna Silvestre-Universidad de Caldas “esta zona se caracteriza por su alta humedad y presencia de cuerpos de agua secundarios, árboles de gran altura, guaduales y zonas bajas con suelos en constante escorrentía (Universidad de Caldas. Grupo de estudio en Fauna Silvestre - Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2008). Actualmente, los arboles alcanzan una altura aproximada entre 15 y 20 m, hay presencia de guadua. En este segmento se puede apreciar el estado sucesional más avanzado del bosque secundario presente en el jardín, y adicionalmente mayor diversidad de especies nativas, se observa de igual forma la presencia de especies exóticas como el aguacate.

#### **4.3. Población microbiana del suelo**

Los microorganismos del suelo, son los componentes más importantes de este ya que constituyen su parte viva y son los responsables de la descomposición, mineralización de complejos orgánicos, translocación de bioproductos y elementos minerales así como contribuir a la Fijación de Nitrógeno Atmosférico. En un solo gramo de tierra fértil, se encuentran millones de microorganismos benéficos para los cultivos, entre los cuales se pueden encontrar: bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoarios y virus que ejercen control sobre las poblaciones bacterias, (Germina, 1993).

La mayoría de los suelos contienen entre  $10^9$  y  $10^{10}$  microorganismos por gramo, (Madigan et al, 2004), las bacterias son las más numerosas llegando a  $10^8$  individuos y pueden estar representados por más de  $10^4$  y  $10^6$  especies diferentes. Solo las bacterias del tipo Actinomicetos llegan a representar entre  $10^6$  y  $10^7$  individuos por gramo, (Sylvia et al, 1999).



## 4.4. Actinomicetos

### 4.4.1. Conceptos Generales

Los *actinomicetos* son bacterias aeróbicas, Gram positivas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simple, complejo y compuestos moleculares orgánicos como: ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuente de nitrógeno: amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas, (Leveaun-Bouix, 2000). Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la mayoría de suelos secos y cálidos donde alcanzan grandes cantidades poblacionales, (Uzcátegui M, *et al*, 2009).

Dentro de sus características específicas, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina. Adicionalmente, presentan una actividad metabólica alta, produciendo terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares hidrolíticas y ligninolíticas con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal por lo cual son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo (Ezziyyani et al., 2004), producen compuestos bioactivos, con actividad antagonista contra microorganismos patógenos, siendo los principales productores de antibióticos, (Kloepper, J.W. 2009).

Particularmente, se han descrito actividades que pueden catalogar a los Actinomicetos como Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. Entre estas actividades cabe destacar la solubilización de fósforo, fijación de Nitrógeno Atmosférico, producción de sideróforos e interacción con otros microorganismos, (Kloepper, J.W. 2009).

En los últimos años se ha incrementado el interés por las aplicaciones de los Actinomicetos a nivel biorremediación en Colombia, pudiéndose observar diferentes trabajos al respecto, como el que presenta en el 2009, Franco-Correa, *et al*, del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Universidad Javeriana, en el cual, se aislaron 10 cepas de *Actinomicetos* de 60 muestras de suelo rizosférico proveniente de diferentes zonas de la región de Boyacá, con el fin de obtener polihidroxicanoatos (PHA). Los PHA son biopolímeros de ácidos grasos que son biosintetizados por las enzimas de estos microorganismos, siendo estudiados para su empleo como poliésteres biodegradables, (Franco-Correa, 2009). Por su parte, Vargas, et al, 2009, ha hecho énfasis en el importante rol que

desempeñan los *actinomicetos* en la biodiversidad de los ecosistemas sostenibles y cómo indican el nivel de salud del suelo. También, Cruz, *et al*, 2009, destaca que en Colombia se conoce poco acerca de la biodiversidad microbiana y su función en la naturaleza. Por ello, se enfocaron especialmente en el papel de los *actinomicetos* sobre la degradación de celulosa y xilano en procesos de compost con residuos orgánicos agrícolas.

#### **4.4.2. Aplicaciones**

Algunos *actinomicetos* han sido descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras, (Tokata et al., 2002). Entre este grupo se encuentran los *Streptomyces* por ser capaces de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, como *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*, (Montesinos, 2007).

Los *Streptomyces* también son importantes a la hora de promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, contribuyendo indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal, (Tokata et al., 2002).

Otros géneros han sido reportados como fijadores de nitrógeno atmosférico, el *Actinomiceto* del género *Frankia* y algunas cepas pertenecientes a las familias *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae*, (Valdés et al., 2005).

##### **4.4.2.1. Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno**

###### **4.4.2.1.1 Streptomyces**

El género *Streptomyces* es uno de los géneros más característicos y conocidos de la división *Actinobacteria*. Se caracterizan por poseer una morfología particular en donde se diferencian dos formas de crecimiento, una primaria o asimilatoria y una secundaria o reproductiva. Las esporas reproductivas asexuales de *Streptomyces* se forman en los extremos de los filamentos aéreos. Si cada espora se deposita en un sustrato adecuado, puede germinar y formar una colonia nueva. Estos microorganismos son aerobios estrictos. A menudo producen enzimas extracelulares que les permiten utilizar las proteínas, polisacáridos como el

almidón, la celulosa y diversas materias orgánicas halladas en el suelo. De un modo característico producen un compuesto gaseoso llamado *geosmina*, que le confiere al suelo su típico aroma a suelo. El género es de gran importancia biotecnológica debido a que produce metabolitos secundarios como los antibióticos que son de amplio uso en medicina humana y veterinaria, así como compuestos represores de tumores, enzimas y vitaminas, (Tohme, 2000).

#### **4.4.2.1.2 Nocardia**

*Nocardia* es un género de bacteria Gram positiva que se encuentra en suelos ricos en materia orgánica, así como en aguas o materia orgánica en descomposición. Se pueden hallar principalmente en zonas tropicales y subtropicales, mientras que son poco frecuentes en zonas templadas o frías. Ciertas especies de nocardias tienen gran importancia clínica como agentes patógenos para el hombre y los animales. Forman filamentos y ramificaciones muy desarrolladas. Poseen micelio vegetativo que se fragmenta en elementos bacilares y cocoides. Los filamentos profundos se separan y toman forma de rosario en cambio, los filamentos aéreos al fragmentarse producen células similares a esporas unicelulares que se dispersan y forman aerosoles. Estos microorganismos pueden reconocerse en el laboratorio por la formación ya sea de colonias lisas, duras, adherentes, cereas o secas que se desarrollan después de tres días a dos semanas de incubación. Se ha descrito que el género *Nocardia* fija nitrógeno atmosférico en el suelo usando como fuentes de carbono glucosa, sucrosa, manitol y celulosa, (Uzcastegui- Negrón, 2009).

#### **4.5. Fijación de Nitrógeno**

La fijación de nitrógeno puede ser abiótica o biológica. La primera se da por procesos químicos espontáneos como la oxidación de nitrógeno atmosférico por acción de rayos solares, descargas eléctricas o por combustión de compuestos orgánicos y por medio de aguas lluvia son arrastrados hacia la biosfera. En tanto, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso llevado a cabo por organismos denominados diazótrofos, en donde el nitrógeno molecular es reducido a amonio e incorporado a la biosfera. Esta propiedad está restringida sólo a procariotas y se encuentra muy repartida entre los diferentes grupos de

bacterias y algunas arqueobacterias. Es un proceso que consume mucha energía y ocurre con la mediación de la enzima nitrogenasa, (Cuervo, 2010).

La fijación de nitrógeno en la biosfera se estima en unos 275 millones de toneladas anuales, de las cuales 175 corresponden a la fijación biológica y 100 a la abiótica. Por lo tanto la fijación biológica supone más del 60% del nitrógeno fijado y por ello es el proceso más importante (Rodríguez – Sevillano, 2009).

#### **4.5.1. Ciclo del Nitrógeno**

El ciclo del Nitrógeno es uno de los más importantes, ya que este elemento se encuentra en varias formas y se llevan a cabo en él una serie de procesos químicos en los que es tomado del aire y es modificado para finalmente ser devuelto a la atmósfera, (Cabrera 2007).

Se encuentra en forma libre y en mayor abundancia en la atmósfera (78 %.). Es uno de los principales elementos biogeoquímicos, sin embargo, gracias a su gran estabilidad, apenas se combina con otros elementos y, por tanto, es difícil que los organismos lo asimilen, ya que primero debe ser desdoblado y empezar así la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y otras moléculas fundamentales para el metabolismo, (Cabrera 2007).

En este sentido, se necesita de una gran cantidad de energía para desdoblarlo y combinarlo con otros elementos como el carbono y el oxígeno. Esta ruptura puede hacerse por dos mecanismos: descargas eléctricas y fijación fotoquímica, que proveen suficiente energía como para formar nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), (Cabrera 2007).

Sin embargo, existe una tercera forma de fijación del nitrógeno que es llevada a cabo por bacterias que usan enzimas en lugar de la luz solar o descargas eléctricas. Estas bacterias son las que viven libres en el suelo o aquellas que en simbiosis, forman nódulos con las raíces de las plantas para fijar el nitrógeno, destacando los géneros *Rhizobium*sp o *Azotobacter*sp. Otro grupo son las cianobacterias acuáticas y las bacterias quimiosintéticas, tales como el género *Nitrosomass*sp y *Nitrosococcus* sp, que juegan un papel muy importante en el ciclo de este elemento, al transformar el amonio en nitrito, mientras que el género *Nitrobacter*sp continúa con la oxidación del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), el cual queda disponible para ser absorbido o disuelto en el agua, pasando así a otros

ecosistemas. Todas las bacterias pertenecientes a estos géneros fijan nitrógeno, tanto como nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) o como amonio ( $\text{NH}_3$ ), (Cabrera 2007).

Hoy en día la Fijación biológica de Nitrógeno cobra más valor dentro del contexto de la agricultura sostenible, pudiéndose evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados que perjudican considerablemente la salud del suelo, (Wheeler y Miller, 1990).

#### **4.5.1.1. Fases del Ciclo**

El ciclo del nitrógeno tiene seis etapas, de las cuales sólo la asimilación no es realizada por bacterias:

##### **4.5.1.1.1. Fijación**

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico, a las plantas, gracias a algunos microorganismos, principalmente bacterias y cianobacterias que se encuentran presentes en el suelo. Esta fijación se da por medio de la conversión de nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) o nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Estos organismos usan la enzima nitrogenasa para su descomposición, (Zagal 2009).

##### **4.5.1.1.2. Nitrificación o mineralización**

Existen dos formas de nitrógeno que son asimilables por las plantas, el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Las raíces pueden absorber ambas formas, aunque pocas especies prefieren absorber nitratos que amoníaco. El amonio es convertido a nitrato gracias a los microorganismos por medio de la nitrificación, (Zagal 2009).

##### **4.5.1.1.3. Asimilación**

La asimilación ocurre cuando las plantas absorben a través de sus raíces, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), elementos formados por la fijación de nitrógeno o por la nitrificación. Luego, estas moléculas son incorporadas tanto a las proteínas, como

a los ácidos nucleicos de las plantas. Cuando los animales consumen los tejidos de las plantas, también asimilan nitrógeno y lo convierten en compuestos animales, (Zagal 2009).

#### **4.5.1.1.4. Amonificación**

Los compuestos proteicos constituyen en mayor medida la materia nitrogenada aportada al suelo, pero tienen poco valor para las plantas al ser añadidos directamente. En cambio, cuando los organismos producen desechos que contienen nitrógeno como la orina (urea), desechos de aves u organismos muertos, éstos son descompuestos por bacterias presentes en el suelo y en el agua, liberando el nitrógeno al medio, bajo la forma de amonio ( $\text{NH}_3$ ). En este nuevo proceso de integración de nitrógeno al ciclo, las bacterias fijadoras llevan a cabo la digestión enzimática, por lo que el amonio se degrada a compuestos aminados, como proteosas, peptonas y al final, en aminoácidos, (Zagal 2009).

#### **4.5.1.1.5. Inmovilización**

Es el proceso contrario a la mineralización, por medio del cual las formas inorgánicas ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) son convertidas a nitrógeno orgánico y, por tanto, no asimilables, (Zagal 2009).

#### **4.5.1.1.6. Desnitrificación**

La reducción de los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ), y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), y es llevado a cabo por las bacterias desnitrificadoras que revierten la acción de las fijadoras de nitrógeno, regresando el nitrógeno a la atmósfera en forma gaseosa, (Zagal 2009). A continuación, en la Figura 2 se observa el esquema del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

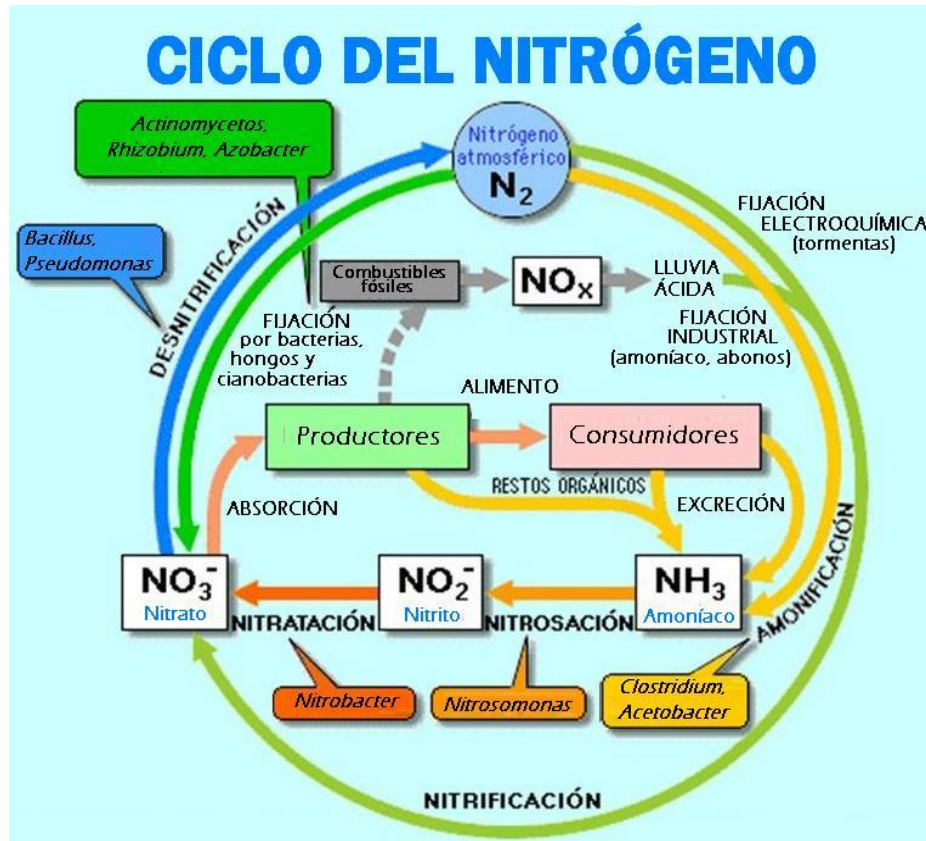


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del Nitrógeno, (Echarri, 1998).

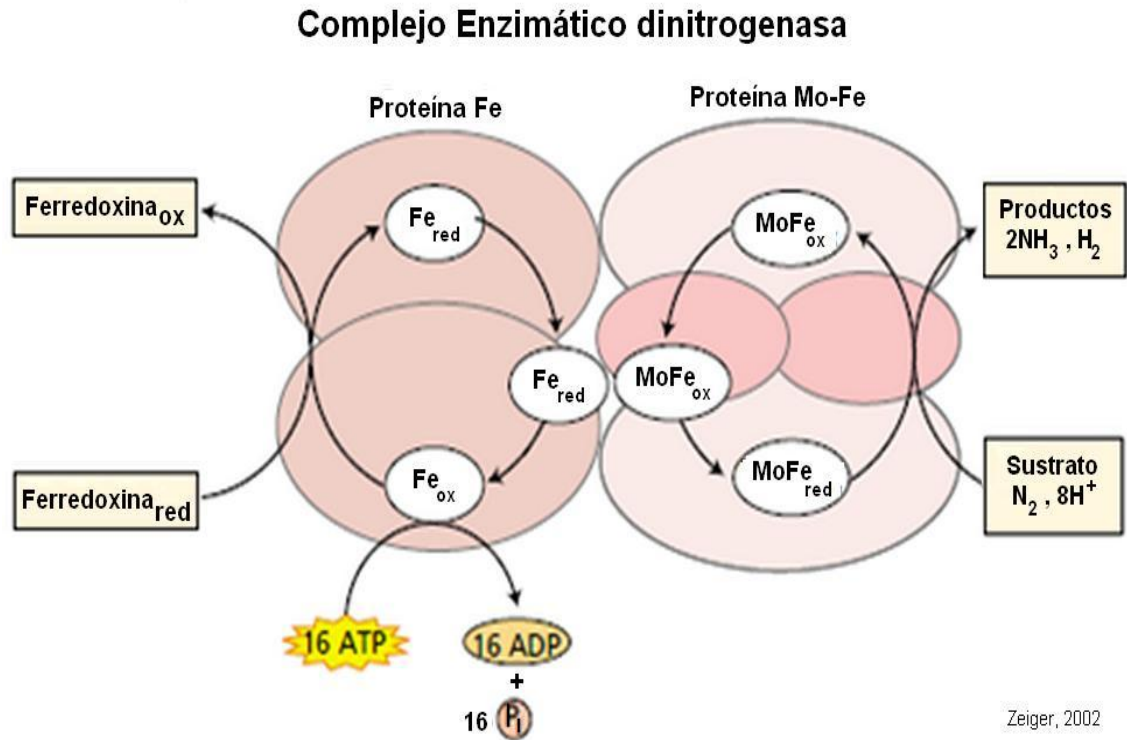
#### 4.5.2. Mecanismo Bioquímico de la Fijación de Nitrógeno

En la fijación biológica de Nitrógeno, éste es reducido a amonio e incorporado directamente a la biosfera (Torralba – Pérez 1997). La reducción es catalizada por un complejo enzimático, la dinitrogenasa (N<sub>2</sub>-asa).

La dinitrogenasa está formada por molibdo-ferroproteína (componente I) y ferroproteína (componente II). El componente I tiene por misión la reducción de nitrógeno a amoníaco, y el componente II la transferencia a I de la energía necesaria para que éste pueda llevar a cabo aquella reducción, (Rodríguez – Sevillano, 2000). El componente I como el responsable de la reducción, requiere de 36 átomos de Hierro para su correcto funcionamiento, para ello la gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno producen sideróforos. Éstos son péptidos con capacidad complejante que convierten los iones Fe<sup>+3</sup> de

pocasolubilidad a complejos de  $\text{Fe}^{+2}$  que pueden ser fácilmente asimilados por mecanismos de transporte activo, (Sylvia, 2005).

En la Figura 3 se describe el mecanismo de la reacción de reducción del Nitrógeno molecular a amonio catalizada por el complejo enzimático dinitrogenasa.



**Figura 3. Reacción catalizada por ladinitrogenasa, (Zeiger, 2002)**

La ferredoxina reduce la proteína Fe. Se piensa que la unión e hidrólisis de ATP a la proteína Fe provoca un cambio conformacional en la proteína que facilita las reacciones redox. La proteína Fe reduce a la proteína Fe-Mo, que a su vez reduce al  $\text{N}_2$ , (Zeiger, 2002).



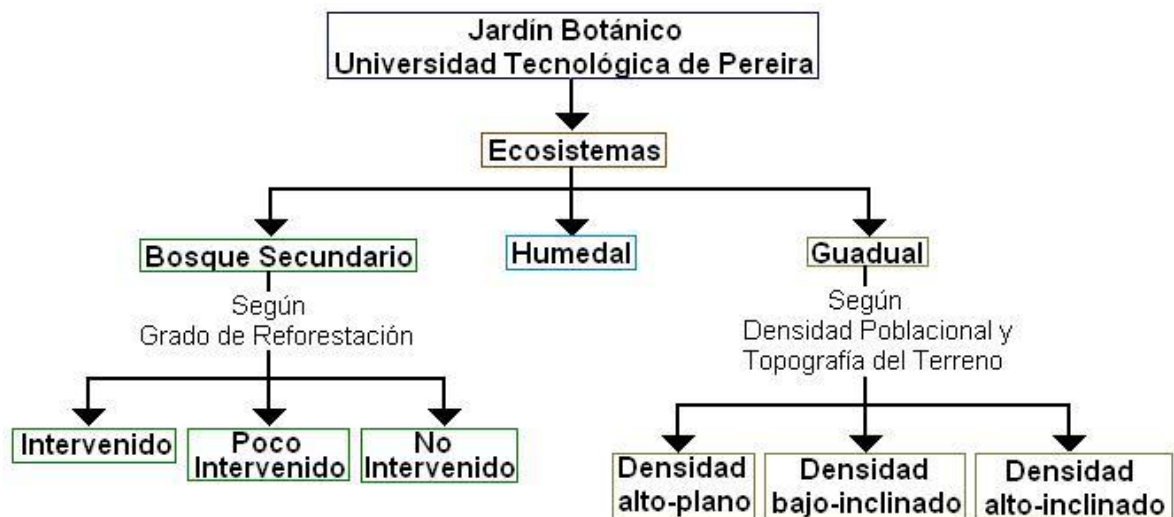
## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. SECCIÓN EXPERIMENTAL

#### 5.1.1. Toma de muestra de suelo

Para la toma de muestra se utilizó el protocolo recomendado por el manual de Laboratorio de Análisis químico de suelos y foliares de la UTP.

Se tomaron muestras de suelo rizosférico de los tres (3) ecosistemas presentes en el JBUTP: Bosque Secundario, Guadual y Humedal, considerando la existencia de sub-ecosistemas en dos (2) de estos entornos. En la Figura 4 se hace una descripción esquemática de los ecosistemas y sub-ecosistemas del JBUTP.



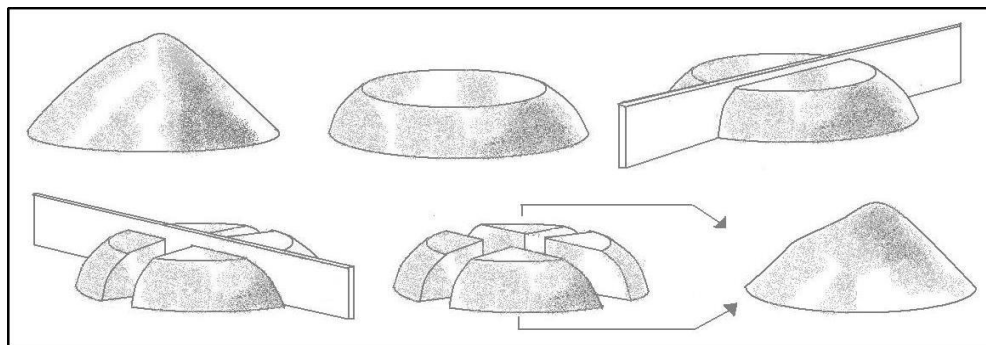
**Figura 4. Ecosistemas y Sub-ecosistemas del JBUTP, (Ospina, B; Dossman M; 2011).**

De esta manera se generan siete (7) puntos específicos de muestreo: tres (3) en Bosque Secundario, tres (3) en Guadual y finalmente uno (1) en Humedal.

Las muestras, seis (6) en total por cada punto de muestreo, se tomaron haciendo uso de palas a partir de una capa de suelo no superior a los 20 cm de profundidad, éstas fueron representativas y se tomaron de forma aleatoria. Se rotuló cada

muestra especificando fecha, hora y sitio de muestreo según su posición geográfica haciendo uso de un equipo GPS mobileMapper10 denotando grados, minutos, segundos, latitud y longitud.

Con el fin de reducir las cantidades de suelo extraídas en cada uno de los siete puntos de muestreo, y haciendo uso del protocolo recomendado en el manual de Laboratorio de Análisis químico de suelos y foliares de la UTP se efectuó el cuarteo de las mismas. Éste tiene como fin llevar las muestras a cantidades menores obteniendo muestras representativas y homogéneas. Para ello, las seis muestras de suelo tomadas por cada uno de los sub-ecosistemas, se disponen sobre una superficie plana previamente desinfectada y con ayuda con una pala se mezclan hasta homogenización completa, retirando raíces, piedras u otra clase de residuos sólidos. Paso seguido, se forma un montón simétrico el cual es dividido en cuatro partes iguales, dos de las cuales son desechadas y las dos restantes son mezcladas nuevamente hasta homogeneidad. Éstos pasos se vuelven a repetir hasta lograr una cantidad de muestra aceptable aproximada de 1 kg. En la Figura 5 se presenta un esquema del proceso.



**Figura 5. Esquema general de un Cuarteo (Fuente: Autores)**

Las siete muestras de suelo cuarteadas son almacenadas en bolsas de cierre hermético y son finalmente dispuestas en nevera a una temperatura de 4°C para su conservación y posterior análisis.

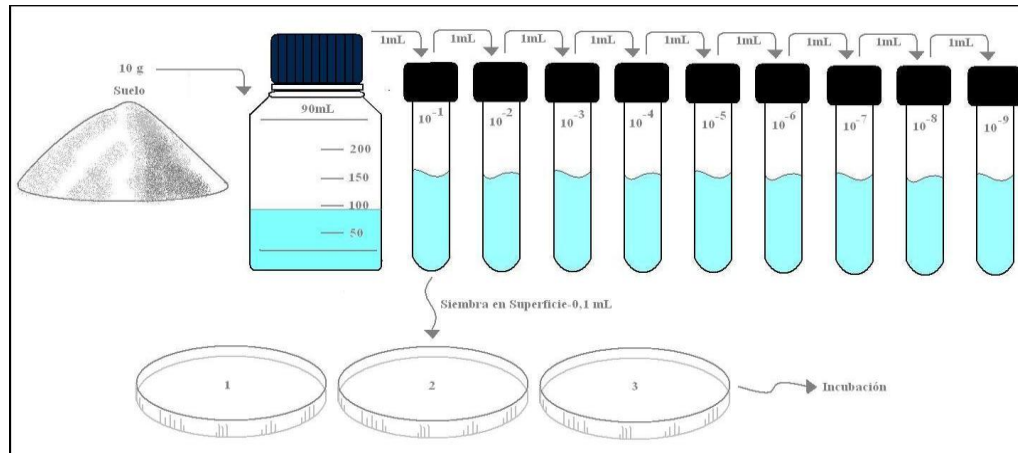
## **5.1.2. Aislamiento y Caracterización de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno**

### **5.1.2.1. Aislamiento y Cuantificación de microorganismos Fijadores de Nitrógeno en Medio Ashby**

Para esta investigación se usó el medio de cultivo Ashby, (Composición en Anexo 1), sugerido por Franco-Correa en 2008 en el marco de su trabajo de Doctorado: 'Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas'. El Medio Ashby es un medio de cultivo libre de Nitrógeno el cual se emplea para el aislamiento de microorganismos con capacidad para Fijar Nitrógeno Atmosférico.

El hecho de que éste medio no contenga Nitrógeno en su composición, permite identificar cepas con potencial Fijación de Nitrógeno al observarse si presentan o no crecimiento sobre el mismo. De esta manera, el crecimiento indica que la cepa es capaz de suplir su necesidad metabólica de Nitrógeno haciendo uso del Nitrógeno Atmosférico presente en la micro-atmósfera que encierra la caja de petri y, por el contrario, cepas con un crecimiento nulo indican que metabólicamente son incapaces de usar este Nitrógeno y por consiguiente son descartadas como posibles fijadoras de Nitrógeno.

Para efectuar este aislamiento se emplea el método de diluciones seriadas, (Ramírez, L 2000), el cual inicia tomando una muestra de 10 gramos de suelo los cuales se adicionan a 90mL de Agua Destilada Estéril (ADE). Esta es la solución madre, de donde al tomar 1mL y depositarlos en 9mL de ADE se prepara la primer dilución  $10^{-1}$ , a partir de esta se lleva a cabo las siguientes diluciones sucesivas hasta llegar a  $10^{-9}$ . Luego, se siembra 0,1mL de cada dilución por superficie en Medio Ashby por triplicado. Finalmente se lleva a Incubación durante 10 días a 28°C, temperatura óptima para el crecimiento de microorganismos mesófilos como son la mayoría de Actinomicetos, (Stanley, 1994). Este procedimiento se repite para cada una de las siete (7) muestras de suelo extraídas, (Ramírez, L 2000). En la Figura 6 se presenta un esquema del proceso.



**Figura 6. Esquema del método diluciones seriadas (Fuente: Autores)**

A partir del día 3 y hasta el día 10 de Incubación se hace el recuento de toda la población microbiana que crece de cada una de las diluciones efectuadas, para luego reportar las unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo, (Ramírez, L 2000). El recuento a parte de permitir la cuantificación de microorganismos con capacidad fijadora de Nitrógeno, permite identificar por observación, colonias con características macroscópicas propias de Actinomicetos como lo son textura seca, polvorosa y adherías al agar. Una vez identificadas son replicadas sucesivamente en Medio Ashby hasta lograr cultivos puros, (Correa 2008).

#### **5.1.2.1.1. Caracterización Macroscópica y Microscópica de Cepas Aisladas en Medio Ashby**

##### **5.1.2.1.1.1. Caracterización Macroscópica**

Se observan las características de crecimiento a nivel macroscópico de cada una de las Colonias crecidas en Medio Ashby considerando: textura, color, forma, superficie y borde. Buscando colonias de aspecto ceroso, polvoroso, adheridas al agar, de colores variantes entre blanco grisáceo, crema, colores tierra y negro, características propias de Actinomicetos, (Rodríguez, 2010).

#### **5.1.2.1.1.2. Caracterización Microscópica**

Considerando que los Actinomicetos presentan una morfología en forma de cocos y son Gram positivos, (Valdés et al., 2005), a través de la Tinción de Gram se efectúa una primera clasificación de las colonias crecidas en Medio Ashby descartando colonias que macroscópicamente son similares a los Actinomicetos pero microscópicamente presentan una morfología diferente.

#### **5.1.2.2. Caracterización de Actinomicetos aislados por el Grupo de Estudio Agrícola (GEA) como Fijadores de Nitrógeno**

En el marco del trabajo de investigación “Clasificación de actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación” a cargo del Grupo de Estudio Agrícola (GEA) en el año 2012, fueron aisladas 22 cepas de Actinomicetos.

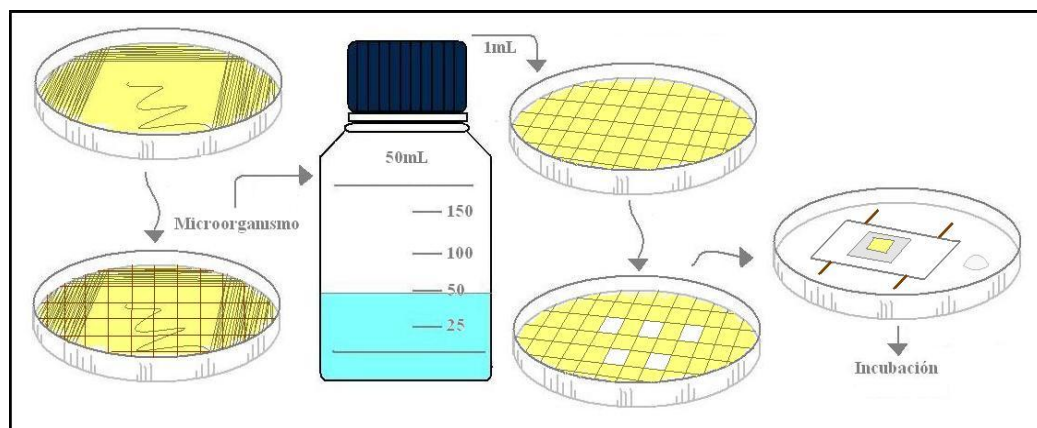
Estas cepas fueron facilitadas por el Grupo GEA con el fin de establecer cuáles eran Fijadoras de Nitrógeno. Para lo cual, fueron replicadas mediante siembra por agotamiento y triplicado sobre el medio de cultivo selectivo libre de Nitrógeno: Medio Ashby. Posteriormente, fueron incubadas a 28°C durante 10 días, (Correa 2008). Al observar del crecimiento de estas cepas durante cuatro (4) replicas sucesivas en el medio selectivo Ashby, se logra establecer cuales poseen o no capacidad fijadora de Nitrógeno, considerando que el crecimiento es indicio de fijación, (Correa 2008).

#### **5.1.3. Identificación en Género de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno según morfología microscópica a través de Microcultivos**

Por medio de la técnica de Ridell, el Microcultivo, se puede observar el crecimiento del micelio aéreo de los Actinomicetos al generarse cultivos sobre un cubreobjetos y portaobjetos. La observación de la ramificación del micelio aéreo según patrones de acuerdo a cada género, ayuda en su identificación al ser comparado con micelios aéreos de Actinomicetos reportados en la clave taxonómica de Bergey, (Rodríguez, 2010). El procedimiento a seguir es el descrito a continuación:

1. Se realiza una siembra de cada microorganismo en medio Ashby por agotamiento.
2. Se corta en forma de cuadro de 1cm de lado y 3mm de espesor con un bisturí estéril y caliente el medio de cultivo inoculado.
3. Se lleva los cuadros a un frasco tapa azul que contenga 50 mL de agua destilada estéril y se realiza agitación constante durante 15 minutos.
4. Se realiza de nuevo el corte en forma de cuadros en una caja de Petri que contiene medio de cultivo Ashby sin inocular para obtener cuadritos de agar que luego serán inoculados con la cepa.
5. Se siembra 1mL de la solución del frasco tapa azul a la caja de Petri del punto anterior, por superficie y se agita para homogenizar la siembra.
6. Se coloca el cuadro de medio Ashby inoculado en un portaobjeto que esta sobre dos palillos en una caja de Petri (previamente esterilizada).
7. Se coloca sobre el Agar un cubreobjeto y se presiona ligeramente para que se adhiera al medio.
8. Se coloca una mota de algodón humedecido con agua destilada estéril en un extremo de la caja de Petri para mantener la humedad.
9. Se incuba la caja a 28°C durante 10 días.
10. Se realizan observaciones los días 3, 6 y 9. Realizando tinción de Azul de Lactofenol al Agar y el cubreobjeto, y tinción de Gram al portaobjeto.
11. Se comparan la estructura miceliales de los días mencionados anteriormente y se comparan con la clave taxonómica de Bergey2000. (Identificación de género parcial).

En la Figura 7 se presenta un esquema del proceso.



**Figura 7. Esquema general Microcultivo (Fuente: Autores)**

#### **5.1.4. Confirmación del Género por medio de Caracterización Bioquímica**

Como se menciona en el libro Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria de MacFaddin en su tercera edición en el año 2000, los ensayos bioquímicos son pruebas simples que se desarrollan para demostrar en forma clara características bioquímicas como presencia o ausencia de una actividad enzimática, grupo de enzimas o vías metabólicas, a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

A partir de las características bioquímicas que se evidencian con la aplicación de estas pruebas, se logra la identificación en género o especie de microorganismos mediante comparación de similitudes con características bioquímicas que han sido reportadas, (MacFaddin, 2000).

A continuación se hace una descripción de las pruebas bioquímicas que se aplican a los Actinomicetos Fijadores de nitrógeno.

##### **5.1.4.1. Prueba de la Oxidasa**

Al ser la mayoría de los actinomicetos aerobios estrictos, la prueba de la Oxidasa permite poner de manifiesto el sistema citocromoxidasa, que se encuentra en organismos de este tipo. Para ello se usó el método directo en donde se adiciona una gota del reactivo de Kovacs sobre las colonias en medio Ashby. El resultado es positivo si se produce una reacción de color violeta a los pocos segundos, (Bailón, 2003).

##### **5.1.4.2. Prueba de la Catalasa**

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias que contienen citocromo. Para ello se deposita una gota de Peróxido de Hidrógeno al 30% sobre un portaobjetos y haciendo uso de un asa de argolla se deposita sobre el reactivo la masa bacteriana. El resultado será positivo si se observa la producción de pequeñas burbujas como resultado de la degradación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, (Bailón, 2003).

##### **5.1.4.3. Reducción de Nitratos**

Algunas enterobacterias como los Actinomicetos tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos. Ésta es una característica utilizada para la identificación y

diferenciación de muchas especies, (Bailón, 2003). Para poner en manifiesto esta capacidad, se inocula las colonias en Caldo Nitratos contenido en tubos de ensayo y se incubaba a 28°C durante 10 días. Transcurrido este tiempo se evalúa la capacidad reductora de Nitratos con la adición de 3 gotas de  $\alpha$ -naftilamina y 3 gotas de ácido sulfanílico observando como resultado positivo una coloración roja a los 30 segundos, (MacFaddin, 2000).

#### **5.1.4.4. Hidrólisis de Urea**

Pone de manifiesto la actividad de la enzima ureasa que poseen ciertos microorganismos, para degradar la urea en dos moléculas de amoníaco. Para ello se inocula la colonia en Caldo Urea contenido en tubos de ensayos y se incubaba a 28°C durante 10 días. Si la Hidrólisis por producción de ureasa es Positiva el medio se torna color rosa fucsia; Si el medio torna a una coloración amarilla es Negativo, (Bailón, 2003).

#### **5.1.4.5. Prueba de la Caseína**

Se utiliza para comprobar la actividad proteolítica de ciertos microorganismos, es decir, su capacidad para degradar proteínas, como lo es en este caso la Caseína. Para ello, se inocula la colonia por punción o picadura haciendo uso de la asa de punta sobre el Agar Calcio Caseína y se incubaba a 28°C durante 10 días. Finalizado el tiempo de incubación se evidencia un halo de transparencia alrededor de las colonias que presenten actividad proteolítica, sino se produce este halo el resultado de la determinación es negativo, (Bailón, 2003).

#### **5.1.4.6. Hidrólisis de Gelatina**

La hidrólisis de Gelatina determina la capacidad de un organismo de producir enzimas proteolíticas, estas enzimas se denominan gelatinazas las cuales son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas. El catabolismo de las proteínas por las gelatinazas se da en dos etapas la primera origina polipéptido y posteriormente estos se desdoblan en aminoácidos individuales, (Bailón, 2003). Para evidenciar esta capacidad se usa Medio Gelatina en tubos de ensayo y se inocula la colonia por picadura usando asa de punta, finalmente se incubaba a 28°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo, se lleva los tubos a refrigeración durante 15 minutos y se observa la consistencia del medio, si este es líquido indica la presencia de enzimas proteolíticas, (MacFaddin, 2000).



#### **5.1.4.7. Prueba de Citratos Simmons**

Determina si el organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y compuesto amoniacales como única fuente de nitrógeno. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones de amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, (Bailón, 2003). Para este caso, se emplea el Agar Simmon's Citato en tubos de ensayo de forma inclinada, se inocula la colonia sembrando por estría usando asa de argolla y se incuba a 28°C durante 10 días. Un color azul en el medio indica que la prueba es positiva, si permanece el color café verdoso del medio es negativa, (MacFaddin, 2000).

#### **5.1.4.8. Fermentación de Lactosa**

La capacidad para fermentar Lactosa se evalúa con base en el crecimiento de las bacterias en agar Mc Conkey, éste es un medio sólido, diferencial y selectivo para cepas que fermenten lactosa. Un resultado positivo se evidencia por la presencia de una coloración rosa en el medio, mientras que un resultado negativo por una coloración amarilla, (Mackenzie, 1996)

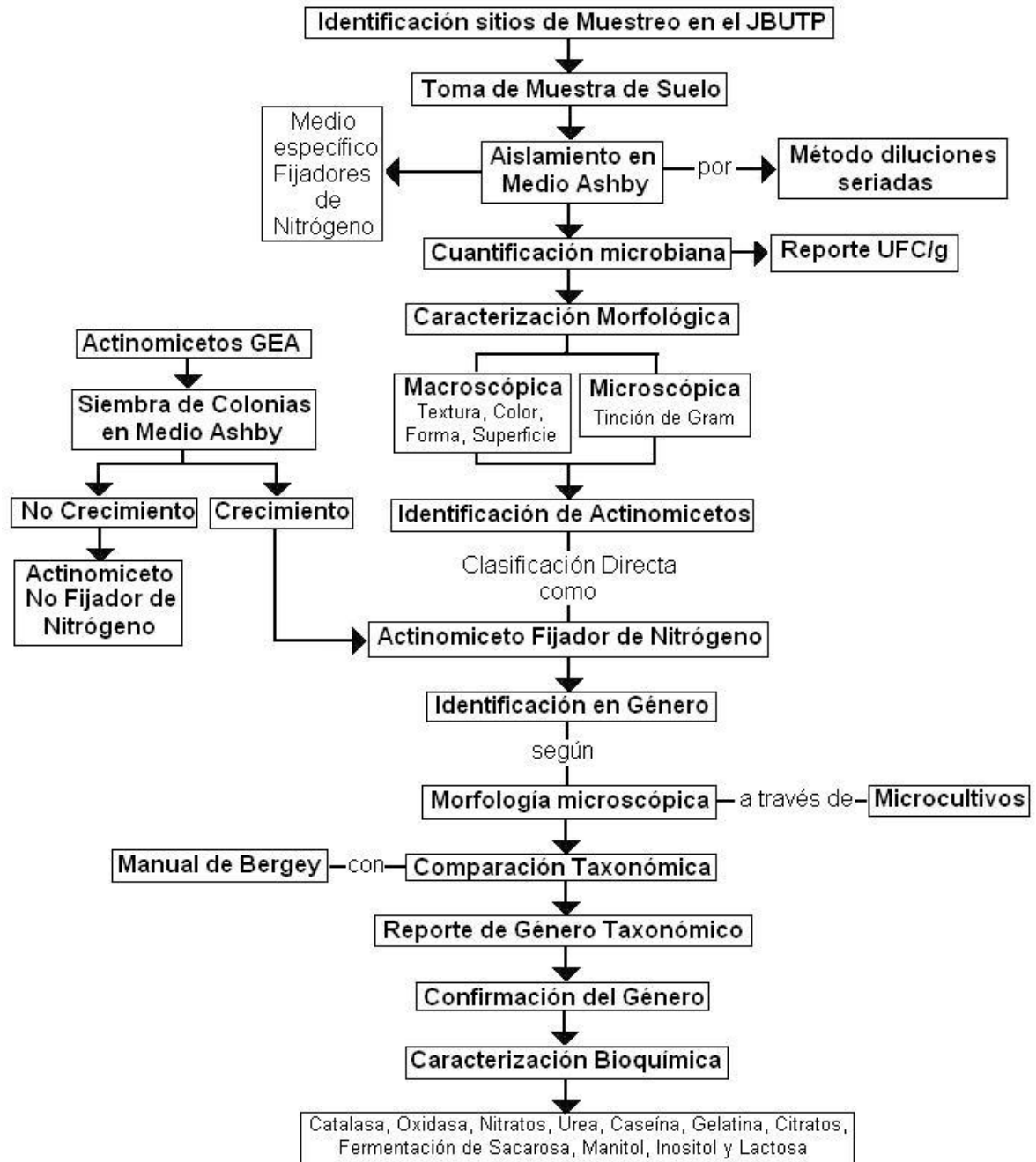
#### **5.1.4.9. Crecimiento anaerobio**

Adicional a la caracterización Bioquímica, existen pruebas que pueden brindar mayor información acerca del comportamiento y las características de las colonias aisladas. Una de ellas es la evaluación del crecimiento en condiciones anaerobias, para ello se realizaron cámaras de anaerobiosis, observando al final de la incubación si hubo crecimiento o no de los microorganismos en estudio, (Rodríguez 2010).



**Figura 8. Cámaras de Anaerobiosis**

En la Figura 9 se presenta un Diagrama Resumen de la Metodología descrita anteriormente.



**Figura 9. Diagrama Metodológico**

## 5.2. Materiales y Equipos

- Cabina de seguridad biológica C4, modelo FLC 120 (Cali, Valle del Cauca; Colombia).
- Incubadora con Temperatura controlada de 28°C, VELP Scientifica, modelo FOC 225 i
- Incubadora con temperatura controlada de 35°C, MLW, NURFÜR 110 v~, Tipo BSU 3, Numero 74089
- Autoclave JP SELECTA, Número de Serie 0464704
- Autoclave MODEL 25X-1
- Microscopio LEICA DM500, CH-9435 Heerbrugg (Switzerland)
- Estereoscopio UNICO ZM181HF
- Balanza analítica OHAUS, modelo PA214 (Lindavista, México D.F, México).
- (Usmate, Monza and Brianza, Italia)
- Vortex Fisher Scientific (Barrington, Illinois, USA)
- pHmetro Shimadzu (Accumet Basic) AB-15. Fisher Scientific.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Localización Geográfica del muestreo

A partir de la información geográfica de los diferentes puntos de muestreo y haciendo uso del programa *ArcView GIS* versión 3.2® y de la herramienta *Google Earth*® se realizó un mapa en el cual se observa claramente la posición de los lotes en los que fueron tomadas las muestras de suelo; cada uno está denotado por un triángulo (Figura 10).

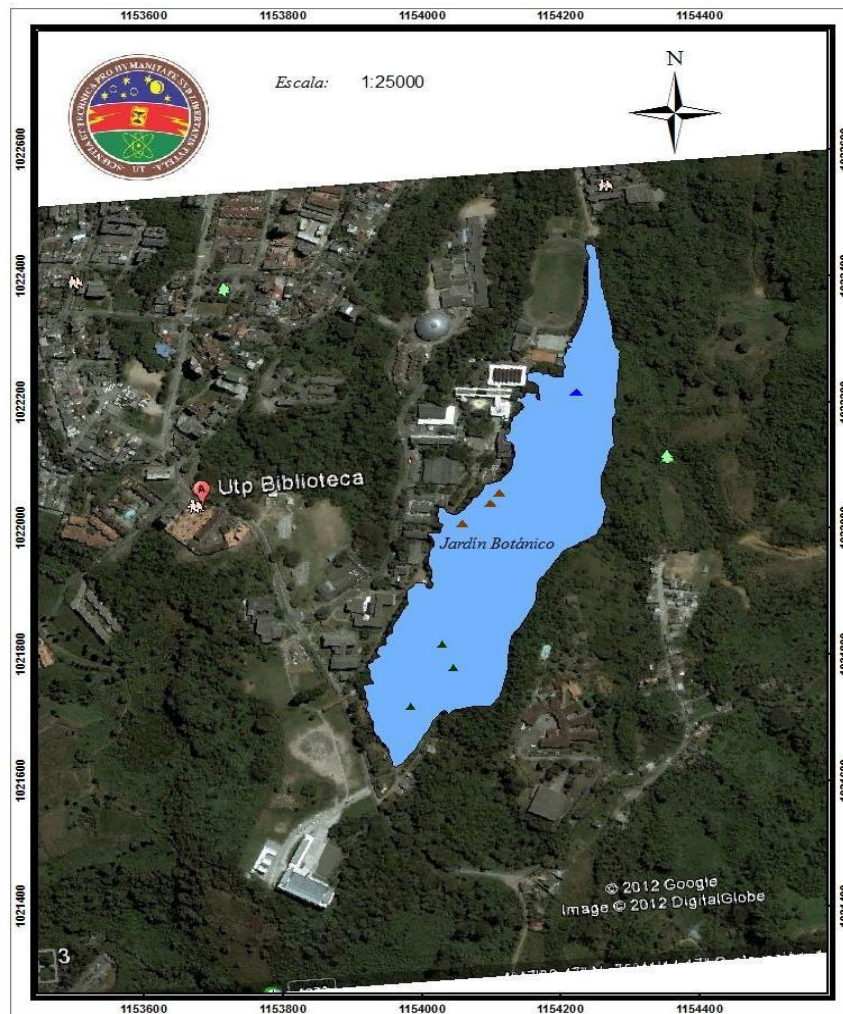


Figura 10. Localización puntos de muestreo

## 6.2. Aislamiento y Caracterización de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno

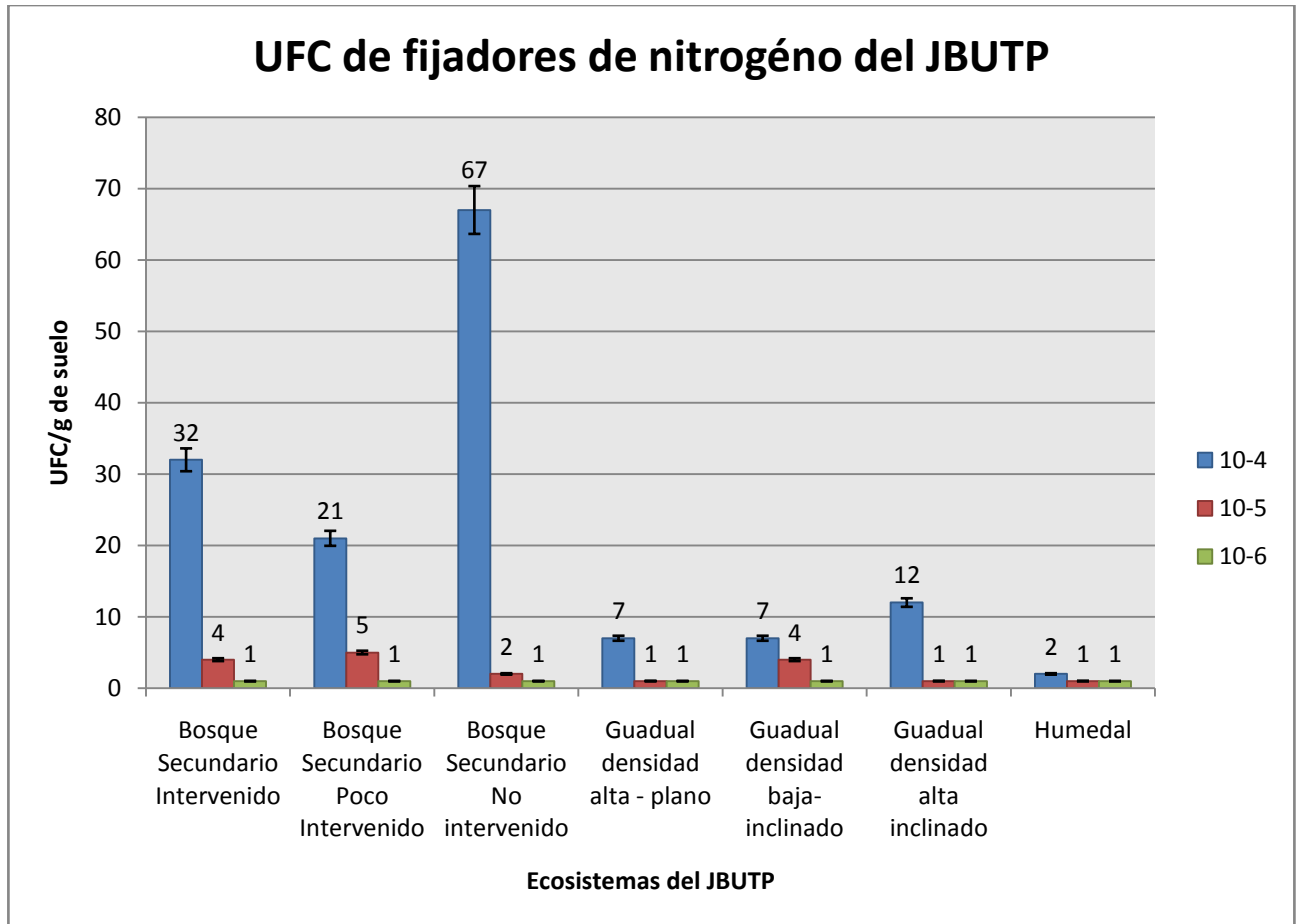
### 6.2.1. Aislamiento y Cuantificación de microorganismos Fijadores de Nitrógeno en Medio Ashby

Se realizó el aislamiento de microorganismos Fijadores de Nitrógeno por medio de la técnica de diluciones seriadas en medio Ashby, (Correa 2008). A continuación, en la Tabla 1 se presenta el reporte de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo de las siete (7) muestras extraídas del JBUTP, correspondientes a los 3 sub-ecosistemas del Bosque Secundario, los 3 sub-ecosistemas de Guadual y al ecosistema Humedal. En el Anexo 2 se presenta el reporte del recuento diario de UFC de las 7 muestras de suelo de forma individual.

**Tabla 1. Reporte Final UFC/g suelo del Aislamiento en Medio Ashby**

<b>Dilución Suelo</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>Bosque Secundario Intervenido</b>	Incontable	Incontable	393	32	4	1	1	0	0
<b>Bosque Secundario Poco Intervenido</b>	Incontable	Incontable	147	21	5	1	1	1	0
<b>Bosque Secundario No Intervenido</b>	Incontable	Incontable	Incontable	67	2	1	0	0	0
<b>Guadual densidad alto-plano</b>	Incontable	Incontable	49	7	1	1	0	0	0
<b>Guadual densidad baja-inclinado</b>	Incontable	Incontable	112	7	4	1	0	0	0
<b>Guadual densidad alta-inclinado</b>	Incontable	Incontable	51	12	1	1	1	1	0
<b>Humedal</b>	Incontable	Incontable	65	2	1	1	1	0	0

En la figura 11 se grafica las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  por su representatividad. Las diluciones menores no brindan información trascendente en la cuantificación de microorganismos fijadores de nitrógeno.



**Figura 11. Gráfica UFC/g de suelo resultantes del aislamiento en Medio Ashby**

El análisis de este gráfico se realizó tomando los valores de la dilución  $10^{-4}$  ya que en ellos se logra evidenciar un cambio significativo en las 7 muestras estudiadas. Debido a la poca trascendencia del reporte ucf/g de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , no se toman en consideración para el análisis.

En la dilución  $10^{-4}$  el sub-ecosistema Bosque secundario no intervenido presenta un mayor número de colonias, debido a que no ha existido una remoción de la vegetación del suelo para dar entrada a otras formas vegetales, orientadas hacia la producción, ni se ha fracturado la superficie de los terrenos. Además los

bosques se caracterizan por tener una mayor diversidad de especies vegetales y un movimiento continuo de nutrientes, debido a que albergan gran variedad de microhábitats con diversos sustratos y acumulación alta y permanente de residuos de diversas especies vegetales (Mantilla, A 2009). El ecosistema gradual teniendo las coberturas más simples debido a la dominancia de un tipo particular de vegetación, presenta los valores más bajos de diversidad microbiana. El ecosistema que presenta menor número de colonias es el humedal, debido a la presencia de sedimentos anaeróbicos que crean un ambiente no propicio para el desarrollo de microorganismos aerobios como es el caso de los fijadores de nitrógeno. (Disalvo, 2009)

En general, en los sub-ecosistemas del Bosque Secundario es donde se encuentra un mayor número de fijadores de nitrógeno, por el proceso en donde los organismos mejor adaptados al desarrollo nuevo del ambiente forestal, gradualmente reemplazan a los organismos de las etapas previas, la sucesión comúnmente es controlada y culmina en un ecosistema estable donde se mantiene la función máxima simbiótica entre los organismos, (Pérez, 1997).

#### **6.2.1.1. Caracterización Macroscópica y Microscópica de Cepas Aisladas en Medio Ashby**

Basándose en características Macroscópicas de Actinomicetos referenciadas en el libro *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Vol.3*, como lo son colonias secas, polvorosas y adheridas al agar; se logra identificar un total de 23 posibles cepas de Actinomicetos, que al ser aisladas en Medio Ashby son calificadas directamente como posible Fijadoras de Nitrógeno. Posteriormente, se realizaron replicas sucesivas de cada colonia en Medio Ashby hasta lograr un cultivo puro y una vez aisladas se evaluaron microscópicamente teniendo en cuenta las características descritas en el libro *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* con el fin de establecer cuáles de estas cepas cumplen con características de Actinomicetos, como ser Gram positivos, presentar morfología en forma de cocos y la presencia de estructuras miceliares.

En la Tabla 2 se presenta el resultado de la caracterización macro y microscópica de las 23 cepas evaluadas como posibles Actinomicetos. Concluyendo cuales de estas son en verdad cepas pertenecientes a este tipo de bacterias mostrándose con un símbolo '+' un resultado positivo y con el símbolo '-' un resultado negativo, siendo el caso cepas descartadas por posibles Actinomicetos.

**Tabla 2. Clasificación Macro y Microscópica de Cepas Aisladas en Medio Ashby**

<b>Ecosistema</b>	<b>Colonia No</b>	<b>Característica Macroscópica</b>	<b>Característica Microscópica</b>	<b>Resultado</b>
<b>Humedal</b>	1	Colonia Cremosa, color blanco, olor semejante a alcohol etílico	Cocos grandes Gram+	-
	2	Colonia Seca, color café	Espiroquetas Gram+	-
<b>Bosque Secundario Intervenido</b>	3	Colonia seca y polvorosa; de forma irregular; color café oscuro en su centro y café claro en el borde	Estreptococos Gram+	+
	4	Colonia seca y polvorosa; de forma irregular; color café oscuro en su centro y café claro en el borde	Estreptococos Gram+	+
	5	Colonia seca y polvorosa; de forma irregular; color café oscuro en su centro y café claro en el borde	Estreptococos Gram+	+
<b>Bosque Secundario Poco Intervenido</b>	6	Colonia seca y polvorosa; de forma irregular; color café oscuro en su centro y café claro en el borde	Estreptococos Gram+	+
	7	Colonia seca, adherida al agar de borde filamentosos; color amarillo con beige en su centro y borde grisáceo	Cocos Gram+	+
	8	Colonia Seca y polvorosa; de forma irregular; color café oscuro en el centro y café claro en el borde	Cocos Gram+	+
	9	Colonia Cremosa, borde redondeado y definido, color blanco, lisa y brillante	Cocos grandes Gram+	-
	10	Colonia Cremosa, de forma ovoide color blanco lisa y brillante	Cocos grandes Gram+	-
	11	Colonia Cremosa de borde redondeado, color amarillo claro, apariencia	Cocos grandes Gram-	-



		mate		
<b>Bosque Secundario No Intervenido</b>	12	Hongo filamentosos, cuerpo fructífero mediano, color café oscuro	Bacilos Gram-	-
<b>Guadual Densidad Alta Plano</b>	13	Hongo filamentosos, cuerpo fructífero grande, color café oscuro	Bacilos Gram -	-
<b>Guadual Densidad Baja Inclinado</b>	14	Colonia seca, adherida al agar; forma irregular; color café claro, borde amarillo y centro café oscuro	Agrupación de cocos Gram +	+
	15	Colonia seca, polvorosa, adherida al agar de forma irregular; color café oscuro con bordes filamentosos color café claro	Cadena de Estreptococos Gram+	+
	16	Colonia Seca, polvorosa, forma irregular; color café claro, con centro naranja oscuro y bordes filamentosos grisáceos	Cocos Gram+	+
	17	Colonia seca, polvorosa, adherida al agar de forma irregular; color café oscuro con bordes filamentosos color café claro	Cadena de Estreptococos Gram+	+
	18	Colonia Seca, aspecto ceroso, adherida al agar de forma irregular; color café claro con centro café oscuro y borde beige	Cadena de Estreptococos Gram+	+
	19	Colonia seca, adherida al agar, forma irregular; color amarillo claro con centro café oscuro y borde filamentosos blanco	Estreptococos Gram+	+
	20	Colonia seca, adherida al agar, forma irregular; color café muy oscuro, borde filamentosos grisáceo	Cadena de Estreptococos Gram+	+
	21	Colonia Seca, esporulada	Bacilos Gram+	-
<b>Guadual Densidad Alta Inclinado</b>	22	Colonia seca, cerosa adherida al agar, forma irregular; color café oscuro, borde filamento	Cadena de Estreptococos Gram+	+

		blanco		
	23	Colonia seca, cerosa adherida al agar, forma irregular; color café oscuro, borde filamento blanco	Cadena de Estreptococos Gram+	+

+, Posible Actinomiceto; -, Colonias Descartadas como Posible Actinomiceto

De estas 23 cepas consideradas posibles Actinomicetos 8 presentaron resultado negativo ya que macroscópicamente no presentan la característica de ser colonias secas de aspecto seroso, en su mayoría presentaron un aspecto cremoso y características de hongos filamentosos, mientras que microscópicamente presentaron morfologías diferentes a la morfología característica de los Actinomicetos: forma de coco, gram positivos y presencia de estructuras miceliales. Así, se obtuvo que 15 de las 23 cepas aisladas en Medio Ashby presentaron resultado positivo frente a las características descritas para Actinomicetos en cuanto a su macro y microscopía.

Algunas de estas 15 cepas confirmadas como Actinomicetos mostraron entre sí semejanzas en cuanto a su morfología macroscópica, principalmente en su aspecto, forma, borde y en su color. Microscópicamente también presentaron similitudes en su morfología, en sus estructuras miceliales y en el gram. Así se generaron un total de 9 colonias. La agrupación y el código asignado a las cepas se describen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Agrupaciones de las Cepas de Actinomicetos Aisladas en Medio Ashby**

<b>CÓDIGO ASIGNADO</b>	<b>Colonias que lo Conforman</b>	<b>Características en común</b>
JBUTP_GEA_BS_A024	Colonia 3, 4, 5 y 6	Colonias de color café, secas, forma irregular. Cadenas de Streptococos, Gram +
JBUTP_GEA_BS_A025	Colonia 7 y 8	Colonias amarillas secas, filamentosas, adheridas al agar con borde filamentosos gris. Cadenas no fragmentadas de Streptococos, Gram +

JBUTP_GEA_G_A026	Colonia 14	Colonia café seca, adherida al agar. Agrupación de cocos, borde irregular, Agrupaciones de cocos, Gram+
JBUTP_GEA_G_A027	Colonia 15 y 17	Colonias de color café, secas, adheridas al agar, borde irregular Micelio no fragmentado, espirales, cadena de Streptococos, Gram +
JBUTP_GEA_G_A028	Colonia 16	Colonia café seca, forma irregular. Agrupaciones de cocos, Gram +
JBUTP_GEA_G_A029	Colonia 18	Colonia café seca, adherida al agar, forma irregular. Cadena de Streptococos, micelio fragmentado con espirales, Gram +
JBUTP_GEA_G_A030	Colonia 19	Colonia amarilla seca, adherida al agar, borde filamentosos. Agrupaciones de cocos, Gram +
JBUTP_GEA_G_A031	Colonia 20	Colonia café seca, adherida al agar, forma irregular. Micelio fragmentado, espirales, cadenas de Streptococos, Gram +
JBUTP_GEA_G_A032	Colonia 22 y 23	Colonia café seca, adherida al agar forma irregular. Micelio fragmentado con espirales. Presencia de conidios, cadenas de Streptococos, Gram +

El código asignado denota el lugar geográfico de donde fueron aisladas cada una de las cepas, quien las aisló y un número consecutivo. Así, a modo de ejemplo, la cepa JBUTP\_GEA\_BS\_A024, puede identificarse como aislada del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira con las siglas JBUTP, que fue aislada por el grupo de estudio agrícola (GEA) y que procede del ecosistema Bosque Secundario (BS). De esta manera cepas aisladas del ecosistema Guadual tienen incluido en su código la letra 'G' y por su parte las aisladas del ecosistema humedal se denotan con la letra 'H'. La letra 'A' que precede al código numérico indica que se trata de una cepa del tipo Actinomiceto.

### 6.2.2. Caracterización de Actinomicetos aislados por el Grupo de Estudio Agrícola (GEA) como Fijadores de Nitrógeno

Las 22 cepas de Actinomicetos facilitadas por el grupo GEA se evaluaron como posibles fijadores de nitrógeno usando el método de siembra en medio selectivo libre de Nitrógeno: Medio Ashby, (Correa 2008). Para ello, se realizaron cuatro (4) replicas sucesivas por triplicado de las 22 cepas con el fin de evaluar, por medio de observación del desarrollo de la masa bacteriana, que cepas son fijadoras al observar crecimiento y que otras no lo son.

En la Tabla 4 se presenta el resultado de la evaluación del crecimiento de las cepas en los cuatro (4) replicados efectuados. El símbolo '+' representa crecimiento de la cepa en estudio, lo que indica potencial fijación de nitrógeno al crecer en un medio libre de este elemento; el símbolo '-' indica crecimiento nulo, por consiguiente, la cepa en cuestión es descartada como posible fijador de nitrógeno. Un resultado demarcado como Positivo indica que la cepa es un Actinomiceto con potencial fijación de nitrógeno, mientras que el resultado negativo indica lo contrario.

Al ser el origen de estas cepas el JBUTP el código asignado por parte del grupo GEA también relaciona al Jardín Botánico de la UTP, el grupo que los aisló, el ecosistema del que provienen y un número consecutivo, tal y como se observa en la Tabla 4, por lo que en adelante las cepas que se han clasificadas como Fijadoras de Nitrógeno conservan este código de origen.

**Tabla 4. Resultado de la evaluación de Actinomicetos aislados en Agar Avena como Fijadores de Nitrógeno.**

<b>CÓDIGO CEPA</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>RESULTADO</b>
JBUTP_GEA_BS_A001	+	-	-	-	Negativo
JBUTP_GEA_BS_A002	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_BS_A003	+	+	-	-	Negativo
JBUTP_GEA_BS_A004	-	-	-	-	Negativo
JBUTP_GEA_BS_A005	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_BS_A006	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_BS_A007	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_BS_A008	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_BS_A009	+	+	+	+	<b>Positivo</b>

JBUTP_GEA_BS_A010	-	-	-	-	Negativo
JBUTP_GEA_G_A011	-	-	-	-	Negativo
JBUTP_GEA_G_A012	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_G_A013	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_G_A014	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_G_A015	+	+	-	-	Negativo
JBUTP_GEA_H_A016	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_H_A017	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_H_A018	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_H_A019	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_H_A020	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
JBUTP_GEA_H_A021	+	-	-	-	Negativo
JBUTP_GEA_H_A022	+	+	+	+	<b>Positivo</b>

R1, Replique 1; R2, Replique 2; R3, Replique 3; R4, Replique 4;

+, Crecimiento; -, Crecimiento Nulo

Así, se concluye que 15 cepas de las 22 analizadas son Fijadoras de Nitrógeno al crecer en un medio libre de éste compuesto, lo cual indica que poseen actividades metabólicas que les permite captar el Nitrógeno Atmosférico que encierra la micro-atmósfera de la caja de petri en que se encuentran y suplir esta necesidad, (Franco-Correa, 2010).

### **6.2.3. Resultado del Aislamiento y Caracterización de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno**

Nueve (9) cepas de Actinomicetos fijadores de Nitrógeno fueron obtenidos a través del aislamiento en Medio Ashby, mientras que la caracterización de los Actinomicetos GEA como fijadores de nitrógeno, permitió la obtención de quince (15) cepas, obteniéndose un total de 24 Actinomicetos con potencial fijador de nitrógeno. En el anexo 3 se encuentra el registro fotográfico de las características macroscópicas y microscópicas de estas 24 cepas.

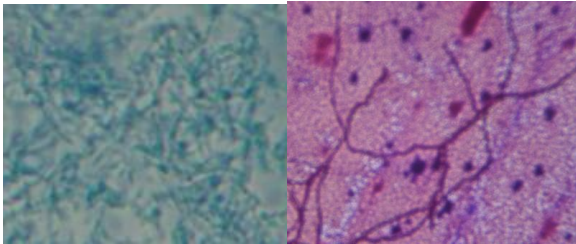
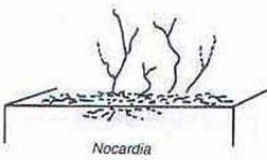
### 6.3. Identificación en Género de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno según morfología microscópica


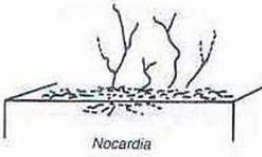
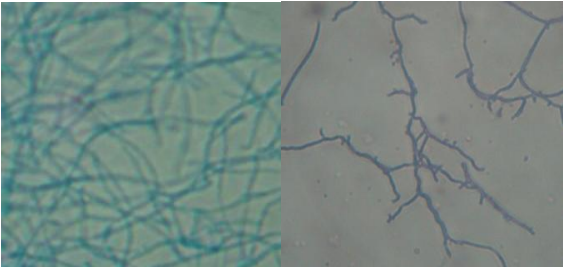
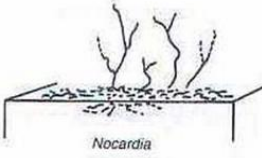
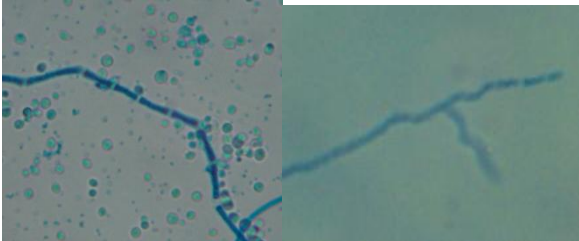
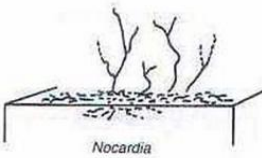
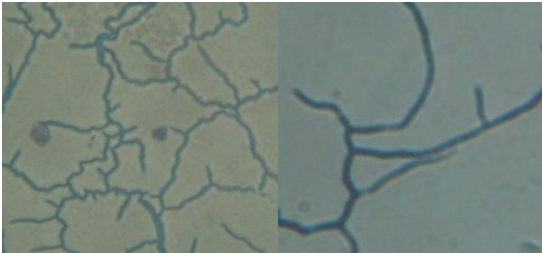
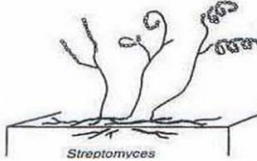
#### 6.3.1. Microcultivo

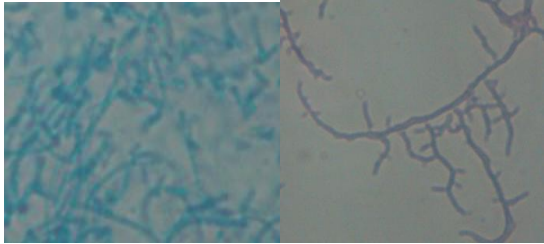
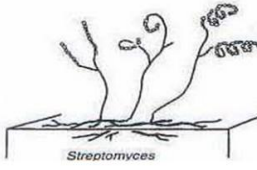
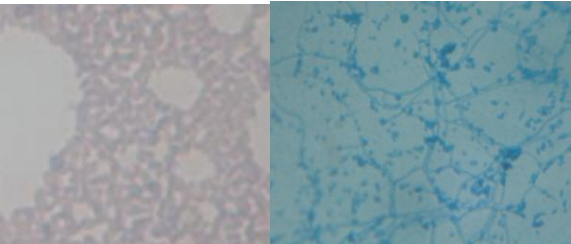
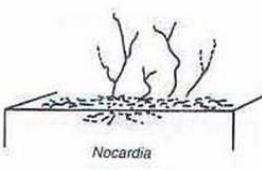

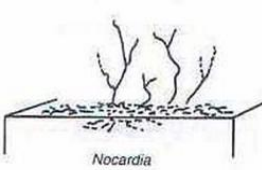
Al ser los Actinomicetos bacterias que producen filamentos delgados y ramificados que se desarrollan en micelios o filamentos individuales y al considerar que cada género de Actinomiceto presenta diferentes tipos de desarrollo, los modos de septación de los filamentos, la presencia y la disposición del micelio vegetativo y la forma del micelio aéreo son herramientas válidas para determinar la identidad a nivel de género de las cepas de Actinomicetos, (Dworkin, 2006)

El Manual Taxonómico de Bergey agrupa en un diagrama esquemático el crecimiento del micelio aéreo característico de cada uno de los géneros de Actinomicetos, (Bergey et al., 2000). Es así como al obtener cultivos puros de cada cepa en un cubre objetos y haciendo uso de un Microscopio objetivo 100x se logró observar el micelio aéreo de las cepas aisladas y comparando con los esquemas reportados en el manual mencionado se logra determinar un posible género para cada una de las cepas. A continuación en la Tabla 5 se presentan imágenes de los micelios generados por cada cepa, la respectiva comparación con los géneros reportados en el Manual de Bergey y su posible género.

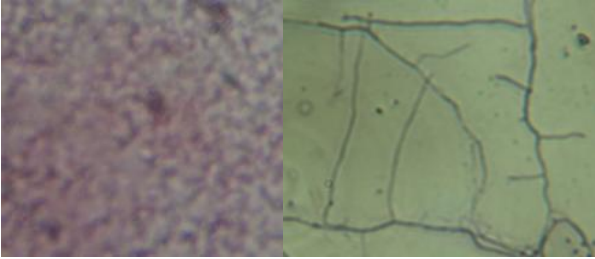
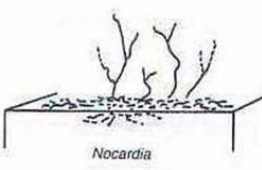
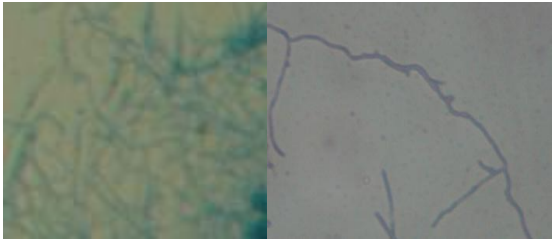
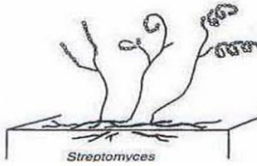
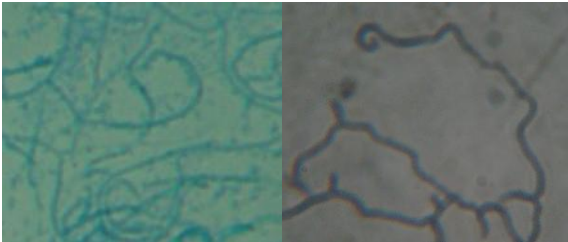
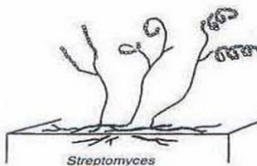
**Tabla 5. Características Microscópicas de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno y posible género**

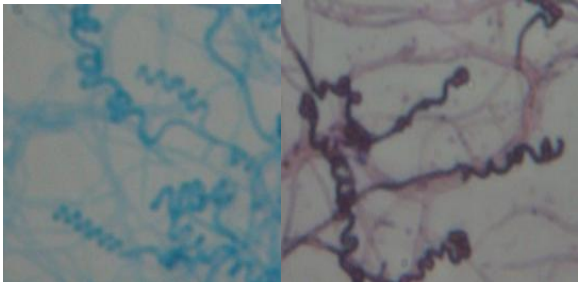
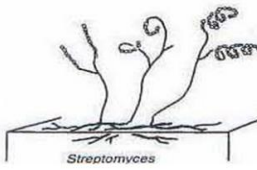
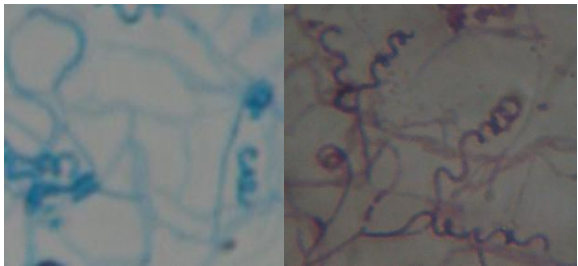
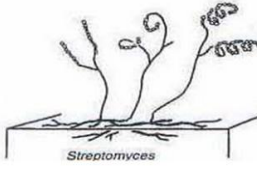
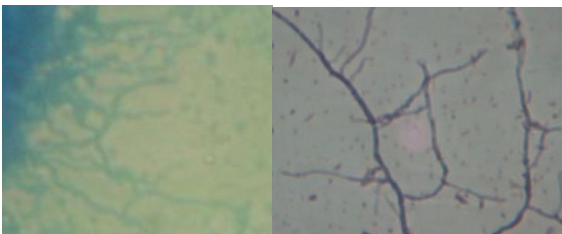
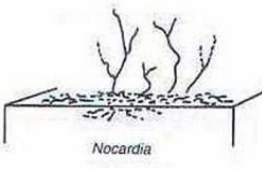
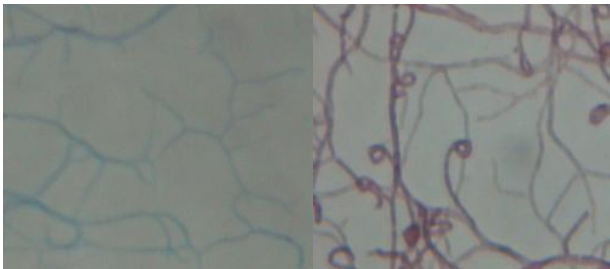
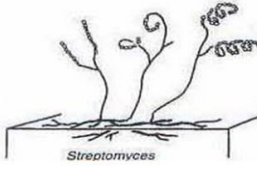
Cepa	Identificación Microscópica		Manual Taxonómico de Bergey	Posible Género
	T Lactofenol	T Gram		
JBUTP_GEA_BS_A002	 <p>Alto crecimiento miceliar vegetativo septado no esporulado, presencia de conidios. Colonia filamentosa</p>		 <p>Nocardia</p>	Nocardia

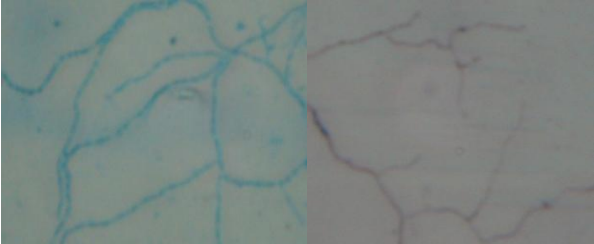
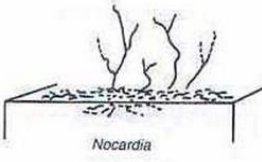
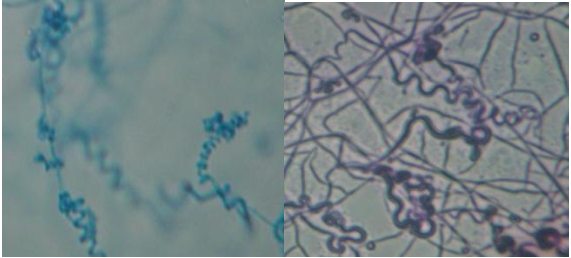



JBUTP_GEA_BS_A005	 <p>Crecimiento micelar vegetativo, filamentos fragmentados, no hay presencia de conidios, ramificaciones pronunciadas</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<i>Nocardia</i>
JBUTP_GEA_BS_A006	 <p>Amplio crecimiento micelar vegetativo ramificado, filamentos profundos no fragmentados, no hay presencia de conidios</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<i>Nocardia</i>
JBUTP_GEA_BS_A007	 <p>Poco crecimiento micelar, filamentos septados, pocas ramificaciones y no hay presencia de conidios.</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<i>Nocardia</i>
JBUTP_GEA_BS_A008	 <p>Crecimiento micelar vegetativo altamente ramificado, presencia de conidios en los extremos de los conidióforos que a su vez se encuentran al final de los filamentos aéreos.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>

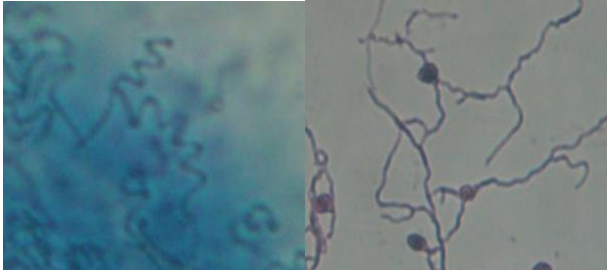
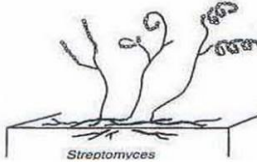
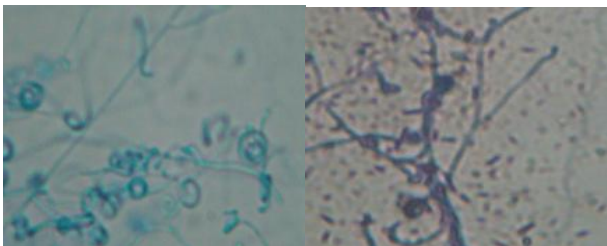
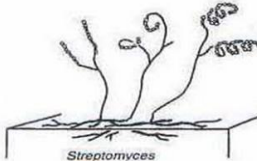
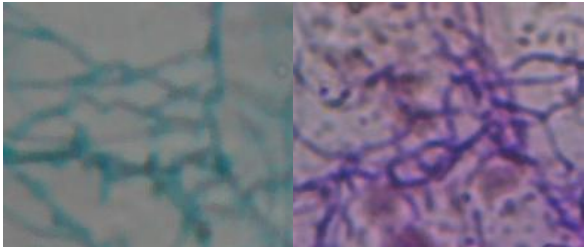
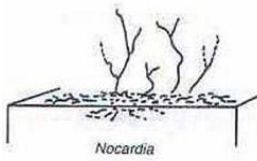
JBUTP_GEA_BS_A009	 <p>Amplio crecimiento micelar vegetativo ramificado no fragmentado, presencia de conidióforos en los filamentos aéreos.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>
JBUTP_GEA_G_A012	 <p>Agrupación de cocos, amplio crecimiento micelar vegetativo ramificado, presencia de conidios.</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<i>Nocardia</i>
JBUTP_GEA_G_A013	 <p>Poco crecimiento micelar vegetativo ramificado, filamentos profundos no fragmentados, no hay presencia de conidios.</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<i>Nocardia</i>
JBUTP_GEA_G_A014	<p>Por medio de la técnica de Microcultivo no se pudo observar con claridad características morfológicas, por ende el género al que pertenece se le dará por medio de sus características macroscópicas y la identificación bioquímica.</p>		

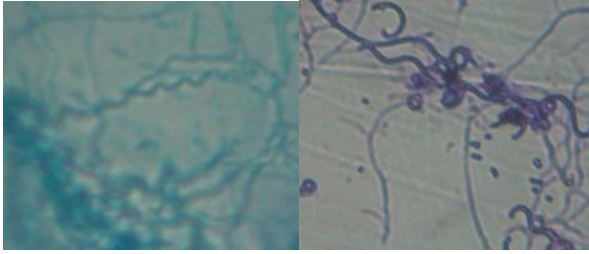
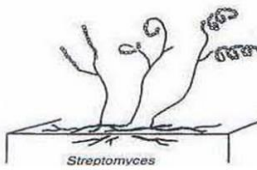
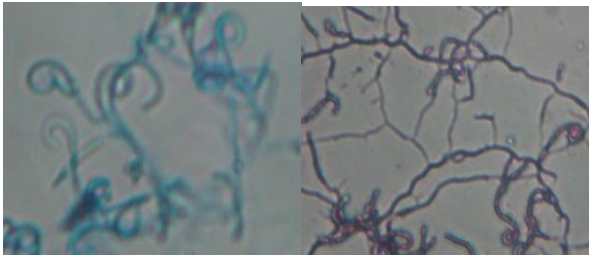
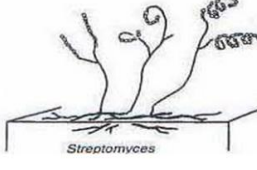


<p>JBUTP_GEA_H_A016</p>	 <p>Agrupación de cocos, amplio crecimiento micelial vegetativo ramificados no fragmentado, no hay presencia de conidios.</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<p><i>Nocardia</i></p>
<p>JBUTP_GEA_H_A017</p>	 <p>Amplio crecimiento micelial vegetativo ramificado no fragmentado, presencia de conidios en los extremos de los conidióforos que a su vez se encuentran en al final de los filamentos aéreos.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p>JBUTP_GEA_H_A018</p>	 <p>Amplio crecimiento micelial ramificado no fragmentado, presencia de conidióforos en los extremos de los filamentos aéreos, que a su vez se encuentran en las terminaciones de las ramificaciones en forma de espirales característicos del género <i>Streptomyces</i></p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<p><i>Streptomyces</i></p>

JBUTP_GEA_H_A019	 <p>Crecimiento micelar ramificado, filamentos en forma de espirales característico del género <i>Streptomyces</i>, alta similitud con la taxonomía del manual de Bergey.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>
JBUTP_GEA_H_A020	 <p>Crecimiento micelar vegetativo, filamentos profundos septados, los extremos de las ramificaciones se encuentran en forma espiralada</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>
JBUTP_GEA_H_A022	 <p>Amplio crecimiento micelar vegetativo ramificado, filamentos aéreos no fragmentados</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<i>Nocardia</i>
JBUTP_GEA_BS_A024	 <p>Crecimiento micelar vegetativo ampliamente ramificado, filamentos en forma de espirales, presencia de conidios.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>

JBUTP_GEA_BS_A025	 <p>Crecimiento miceliar, ramificaciones ampliamente septadas y filamentosas, no hay presencia de conidios</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<i>Nocardia</i>
JBUTP_GEA_G_A026	 <p>Crecimiento miceliar vegetativo, filamentos en forma de espirales característico del género <i>Streptomyces</i>, alta similitud con la taxonomía del manual de Bergey.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>
JBUTP_GEA_G_A027	 <p>Amplio crecimiento miceliar vegetativo ramificado no fragmentado, filamentos en forma de espirales característico del género <i>Streptomyces</i>, alta similitud con la taxonomía del manual de Bergey</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>

<p>JBUTP_GEA_G_A028</p>	 <p>Micelio vegetativo, filamentos aéreos no fragmentados con presencia de conidióforos, ramificaciones en forma de espirales, característico del género <i>Streptomyces</i>.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p>JBUTP_GEA_G_A029</p>	 <p>Poco crecimiento micelar, filamentos no fragmentados, ramificaciones en forma de espiral, característica morfológica del género <i>Streptomyces</i>.</p>	 <p><i>Streptomyces</i></p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p>JBUTP_GEA_G_A030</p>	 <p>Crecimiento micelar vegetativo, ramificaciones no fragmentadas, no hay presencia de conidióforos.</p>	 <p><i>Nocardia</i></p>	<p><i>Nocardia</i></p>

JBUTP_GEA_G_A031	 <p data-bbox="423 590 1019 674">Crecimiento miceliar, filamentos ramificados aéreos con presencia de conidióforos, ramificaciones en forma de espirales, característico del género <i>Streptomyces</i>.</p>	 <p data-bbox="1354 485 1507 516"><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>
JBUTP_GEA_G_A032	 <p data-bbox="423 989 1019 1073">Filamentos profundos no fragmentados y aéreos con ramificaciones en forma de espirales, presencia de conidios en los extremos de los conidióforos.</p>	 <p data-bbox="1354 873 1507 905"><i>Streptomyces</i></p>	<i>Streptomyces</i>

Los resultados de la microscopía muestran que las cepas JBUTP\_GEA\_BS\_A008, JBUTP\_GEA\_BS\_A009, JBUTP\_GEA\_H\_A017, JBUTP\_GEA\_H\_A018, JBUTP\_GEA\_H\_A019, JBUTP\_GEA\_H\_A020, JBUTP\_GEA\_BS\_A024, JBUTP\_GEA\_G\_A026, JBUTP\_GEA\_G\_A027 JBUTP\_GEA\_G\_A028, JBUTP\_GEA\_G\_A029, JBUTP\_GEA\_G\_A031 y JBUTP\_GEA\_G\_A032 se pueden identificar con claridad como pertenecientes al género *Streptomyces*, el cual presenta características como la no fragmentación del micelio de sustrato, la fragmentación del micelio aéreo y la formación de cadenas de conidias en forma de cocos o bacilos en disposición de espiral, (Dworkin, 2006)

Las cepas JBUTP\_GEA\_BS\_A002, JBUTP\_GEA\_BS\_A005, JBUTP\_GEA\_BS\_A006, JBUTP\_GEA\_BS\_A007, JBUTP\_GEA\_G\_A012, JBUTP\_GEA\_G\_A013, JBUTP\_GEA\_H\_A016, JBUTP\_GEA\_H\_A022, JBUTP\_GEA\_BS\_A025, JBUTP\_GEA\_G\_A030, presentan filamentos ramificados septados con pocas conidias, morfología asociable al género *Nocardia*.

La caracterización microscópica de la cepa JBUTP\_GEA\_G\_A014 no indicó un rasgo particular que permitiera clasificarla dentro de un grupo en específico, por eso el género al que pertenece se da en base a sus características macroscópicas y la identificación bioquímica.

En la tabla 13 se observa el total de 24 colonias de Actinomicetos fijadores de nitrógeno, de las cuales trece (13) cepas pertenecen al género de *Streptomyces*, diez (10) cepas al género *Nocardia* y una (1) que no pudo ser identificada.

**Tabla 6. Reporte del género de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno**

<b>CEPA</b>	<b>GÉNERO</b>
JBUTP_GEA_BS_A002	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A005	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A006	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A007	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A008	Streptomyces
JBUTP_GEA_BS_A009	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A012	Nocardia
JBUTP_GEA_G_A013	Nocardia
JBUTP_GEA_G_A014	No identificado
JBUTP_GEA_H_A016	Nocardia
JBUTP_GEA_H_A017	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A018	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A019	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A020	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A022	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A024	Streptomyces
JBUTP_GEA_BS_A025	Nocardia
JBUTP_GEA_G_A026	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A027	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A028	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A029	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A030	Nocardia
JBUTP_GEA_G_A031	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A032	Streptomyces

#### 6.4. Confirmación del Género por medio de Caracterización Bioquímica

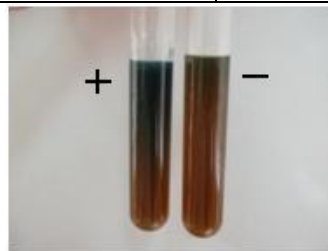
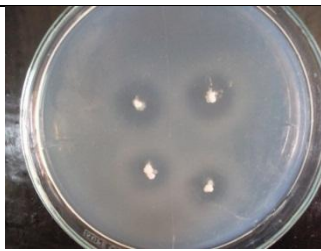
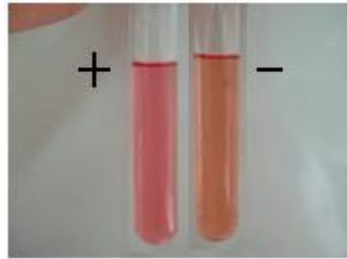
Para realizar la confirmación del género reportado en el punto anterior, se efectuó una serie de pruebas que pusieran en manifiesto las características bioquímicas de las cepas clasificadas según medio de cultivo selectivo como Fijadoras de Nitrógeno. Los resultados obtenidos para cada cepa fueron comparados midiendo el grado de similitud con resultados referencia reportados para diferentes géneros de Actinomicetos en el libro Bergey's Manual of Systematic Bacteriology y en el libro The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Vol.3.

Las características bioquímicas determinantes para realizar la identificación en género de los Actinomicetos, se evaluaron con la aplicación de pruebas como la Catalasa y la Oxidasa, Hidrólisis de la Urea y Gelatina, Reducción de Nitratos Prueba de la Caseína, Prueba de Citratos, así como la evaluación del crecimiento en condiciones anaerobias. A continuación, en la Tabla 7 se describe la forma en que se evidencia un resultado positivo y negativo en cada prueba bioquímica aplicada.

**Tabla 7. Resumen Fotográfico Pruebas Bioquímicas**

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO POSITIVO	RESULTADO NEGATIVO
Prueba de la Catalasa	 Producción de burbujas	 No burbujeo
Prueba de la Oxidasa		

	Coloración violeta alrededor de la colonia a los pocos segundos	No Coloración violeta
Hidrólisis de Urea	Coloración rosa en el medio en el medio	Coloración amarilla
Prueba de la Caseína	Halo de transparencia alrededor de colonias	No presencia de halo
Prueba de Citratos	Cambio en la coloración del medio a azul oscuro	Persistencia del color marrón del medio original
Fermentación de Lactosa	Coloración Rosa en el medio	Coloración amarilla en el medio
Crecimiento anaerobio	Crecimiento del Microorganismo	Crecimiento Nulo del Microorga





#### 6.4.1. Resultados confirmación de Género

Cuando se tiene indicios de la posible identidad de una determinada bacteria, realizar una caracterización bioquímica que ponga en manifiesto vías metabólicas o actividades enzimáticas propias ella es de gran ayuda, (MacFaddin, 2000). La comparación de similitudes con características bioquímicas de microorganismos conocidos y referenciados logra establecer una identidad más confiable.

Considerando que las 24 cepas de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno fueron identificadas morfológicamente dentro de los posibles géneros *Nocardia* y *Streptomyces*, los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a cada cepa son comparados con resultados referencia para estos dos géneros identificados. En la Tabla 8 se registran las características bioquímicas de los géneros *Nocardia* sp y *Streptomyces* sp tomados como referencia comparativa.

**Tabla 8. Características Bioquímicas Cepas de Referencia, (Bergey, 2005 & Dworkin, 2006)**

Referencia Prueba Bioquímica	<i>Streptomyces</i> sp	<i>Nocardia</i> sp
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Urea	+	+
Gelatina	+	+
Nitratos	-	+
Caseína	+	-
Citratos	d	-
Anaerobio	-	-

+, Resultado positivo; - Resultado negativo; d: No dato disponible

De esta manera, las características bioquímicas de cepas descritas como pertenecientes al género *Streptomyces* por morfología microscópica, son comparadas con las características reportadas para este género en específico. Y, características bioquímicas de cepas descritas como *Nocardia* son comparadas con las reportadas para este género en concreto.

En la Tabla 9 y 10 se reportan respectivamente los resultados de la caracterización bioquímica de cepas descritas como pertenecientes a los géneros *Streptomyces* y *Nocardia*.

**Tabla 9. Resultados caracterización bioquímica de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno y comparación con resultados referencia para *Streptomyces sp.***

Cepa \ Prueba Bioquímica	Catalasa	Oxidasa	Urea	Gelatina	Nitratos	Caseína	Citratos	Lactosa	Anaerobio
<b>Streptomyces sp</b>	+	-	+	+	-	+	d	d	-
JBUTP_GEA_BS_A008	+	-	+	+	-	-	+	+	-
JBUTP_GEA_BS_A009	-	-	+	+	-	+	+	+	-
JBUTP_GEA_H_A017	+	-	+	+	-	-	+	-	-
JBUTP_GEA_H_A018	+	-	+	+	+	+	+	-	-
JBUTP_GEA_H_A019	-	-	+	+	-	+	-	+	-
JBUTP_GEA_H_A020	+	-	+	+	+	-	+	-	-
JBUTP_GEA_BS_A024	+	+	+	+	-	+	-	-	-
JBUTP_GEA_G_A026	+	-	+	+	+	+	-	+	-
JBUTP_GEA_G_A027	+	-	+	+	+	+	-	+	-
JBUTP_GEA_G_A028	+	-	+	+	+	-	+	+	-
JBUTP_GEA_G_A029	+	+	+	+	-	+	-	+	-
JBUTP_GEA_G_A031	+	-	+	+	+	+	+	+	-
JBUTP_GEA_G_A032	+	-	+	+	+	+	-	+	-

+, Resultado positivo; - Resultado negativo; d: No dato disponible

**Tabla 10. Resultados caracterización bioquímica de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno y comparación con resultados referencia para *Nocardia sp.***

<b>Cepa</b> \ <b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>Urea</b>	<b>Gelatina</b>	<b>Nitratos</b>	<b>Caseína</b>	<b>Citratos</b>	<b>Lactosa</b>	<b>Anaerobio</b>
<b><i>Nocardia sp</i></b>	+	-	+	+	+	-	-	d	-
JBUTP_GEA_BS_A002	+	-	+	-	+	-	+	-	-
JBUTP_GEA_BS_A005	-	-	+	+	+	-	-	+	-
JBUTP_GEA_BS_A006	+	-	+	+	+	+	-	-	-
JBUTP_GEA_BS_A007	+	-	+	+	+	+	+	-	-
JBUTP_GEA_G_A012	+	-	+	+	+	-	+	-	-
JBUTP_GEA_G_A013	+	-	+	+	-	-	+	-	-
JBUTP_GEA_G_A014	+	-	-	+	+	-	-	-	-
JBUTP_GEA_H_A016	+	-	+	+	+	-	+	-	-
JBUTP_GEA_H_A022	+	-	+	+	+	+	-	-	-
JBUTP_GEA_BS_A025	-	-	+	+	+	-	-	-	-
JBUTP_GEA_G_A030	+	-	+	+	+	-	+	-	-

+, Resultado positivo; - Resultado negativo; d: No dato disponible

Es así como al comparar el comportamiento bioquímico de las cepas descritas como *Streptomyces*, gracias a sus características microscópicas como la presencia de micelios en forma de espiral con los resultados referencia para este género se puede ver que las cepas JBUTP\_GEA\_BS\_A008, JBUTP\_GEA\_BS\_A009, JBUTP\_GEA\_H\_A017, JBUTP\_GEA\_H\_A018, JBUTP\_GEA\_H\_A019, JBUTP\_GEA\_BS\_A024, JBUTP\_GEA\_G\_A026, JBUTP\_GEA\_G\_A027, JBUTP\_GEA\_G\_A029, JBUTP\_GEA\_G\_A031 y JBUTP\_GEA\_G\_A032 coinciden en 6 de las 7 características estudiadas para el género *Streptomyces*.

Las cepas JBUTP\_GEA\_H\_A020 y JBUTP\_GEA\_G\_A028 presentan una microscopía propia del género *Streptomyces* y su patrón bioquímico coincide en 5 de las 7 características estudiadas.

Por su parte, al comparar los resultados para cada característica bioquímica de las cepas asociadas al género *Nocardia* por presentar micelios ramificados y

entramados, con los valores referencia, se observa que las cepas JBUTP\_GEA\_BS\_A005, JBUTP\_GEA\_BS\_A006, JBUTP\_GEA\_G\_A012, JBUTP\_GEA\_H\_A016, JBUTP\_GEA\_H\_A022, JBUTP\_GEA\_BS\_A025, JBUTP\_GEA\_G\_A030 presentan una coincidencia en 7 de las 8 características estudiadas.

Las cepas JBUTP\_GEA\_BS\_A002, JBUTP\_GEA\_BS\_A007 y JBUTP\_GEA\_G\_A013 muestran una coincidencia de 6 en las 8 características estudiadas.

La cepa JBUTP\_GEA\_G\_A014 muestra características macroscópicas y microscópicas de Actinomiceto. Al no lograrse identificar en ella estructuras miceliales que la orienten hacia un posible género, la comparación de sus características bioquímicas permite asociarla con cepas del género *Nocardia* al coincidir en 7 de las 8 características estudiadas.

## **6.5. Evaluación *invitro* del efecto de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno sobre el desarrollo de plantas de Lechuga**

Adicional a los objetivos planteados en el trabajo de investigación se pretendió ahondar más en conocimiento acerca de las cepas que se lograron aislar e identificar. Por ello, se llevó a cabo una evaluación in-vitro de los posibles efectos de los Actinomicetos clasificados como Fijadores de Nitrógeno sobre el crecimiento de semillas germinadas de Lechuga (*Lactuca sativa L.*).

### **6.5.1. Parte Experimental**

#### **6.5.1.1. La Planta**

La planta seleccionada para la realización de los ensayos fue Lechuga de la variedad Black Seeded Simpson, la cual pertenece a la división de las Magnoliophytas y a la familia de las Asteraceae. Esta es una planta que se halla extendida por todo el mundo ya que sus hojas forman parte de la alimentación mundial. Las plantaciones de Lechuga se adaptan a muchos tipos de terrenos, son de preferencia suelos ricos en materia orgánica y ricos en nitrógeno. El pH ideal para su cultivo oscila entre 6,5 y 7,5, (Hernández, J., 2009).

Se escogió esta planta gracias a que es de rápida germinación, de 2 a 3 días en condiciones estándar y es de rápido crecimiento. Además, al ser ésta una planta que requiere para su desarrollo cantidades apreciables de Nitrógeno, (Hernández, J., 2009) nos brinda las herramientas adecuadas para evaluar el posible efecto que tendrían las cepas fijadoras de Nitrógeno aisladas sobre el crecimiento de semillas de Lechuga germinadas.

#### **6.5.1.2. Semillas**

Las semillas de Lechuga (*Lactuca sativa L.*) que fueron adquiridas, son distribuidas por la empresa Fercon S.A. de la ciudad de Cali-Colombia.

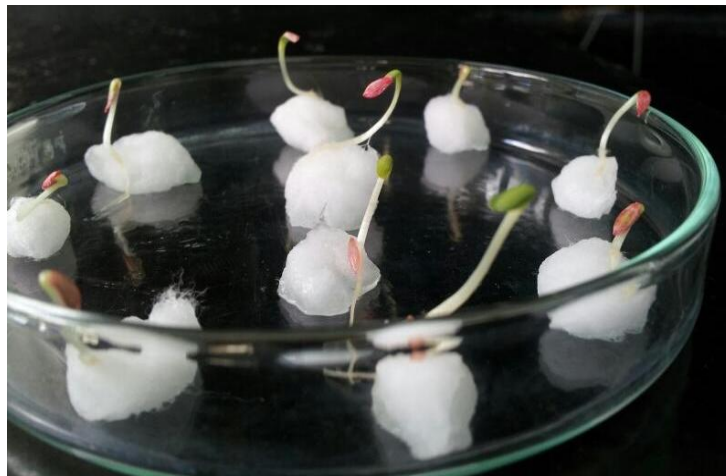
##### **6.5.1.2.1. Esterilización de las Semillas**

Las semillas de Lechuga fueron desinfectadas sumergiéndolas en hipoclorito de Sodio al 10%, durante 15 min y agitación constante. A continuación se lavaron 3 veces con abundante agua destilada estéril, (Vargas, P, 2001)

#### 6.5.1.2.2. Germinación de las Semillas

Cuando las semillas son recolectadas se almacenan durante un tiempo recomendado de 1 año y 3 meses antes de poder ser usadas para la siembra ya que ellas pasan por un estado de latencia, es decir, se encuentran en un ambiente óptimo para germinación, temperatura y agua favorable, buena disponibilidad de oxígeno, pero no logran germinar. Hoy en día, se desconoce con precisión el tiempo que comprend la experiencia ha demostrado que semillas con tiempo de madurez menor de un año, no germinan o tienen menor porcentaje de germinación que aquellas que han sido almacenadas más de un año para su cultivo, (Hernández, J., 2009).

Por esta razón, al desconocer el estado de madurez de las semillas adquiridas se realiza un montaje con el fin de determinar el potencial de germinación real de estas. Para lo cual, se tomaron un total de 400 semillas, las cuales fueron previamente desinfectadas y colocadas en cajas de petri. Fueron ubicadas 10 semillas por caja, cada una de ellas sobre una mota estéril de algodón humedecido con agua destilada estéril, generando así un total de 40 repeticiones. Finalmente, se observó el desarrollo de las semillas durante 5 días. El montaje se muestra en la Figura 12.



**Figura 12. Montaje germinación de semillas de Lechuga desinfectadas**

### 6.5.1.3. Inóculos Bacterianos

#### 6.5.1.3.1. Escala de McFarland

Esta escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico, de esta manera se generan patrones a escala que van desde 0,5 a 10, en donde la turbidez estándar 0,5 es equivalente a aproximadamente  $10^8$  bacterias por mL, (OMS, 2004).

La preparación de la escala se realiza mediante la mezcla de cantidades determinadas de Cloruro de Bario al 1% y de Ácido Sulfúrico al 1%. La Tabla 11 muestra las composiciones de cada valor en la escala, (OMS, 2004)

**Tabla 11. Composición de la turbidez estándar de McFarland, (OMS, 2004).**

No. de la escala	Cloruro de Bario 1%(mL)	Ácido Sulfúrico 1%(mL)	Densidad aproximada de bacterias
0,5	0,5	99,5	$1 \times 10^8$
1	0,1	9,9	$3 \times 10^8$
2	0,2	9,8	$6 \times 10^8$
3	0,3	9,7	$9 \times 10^8$
4	0,4	9,6	$12 \times 10^8$
5	0,5	9,5	$15 \times 10^8$
6	0,6	9,4	$18 \times 10^8$
7	0,7	9,3	$21 \times 10^8$
8	0,8	9,2	$24 \times 10^8$
9	0,9	9,1	$27 \times 10^8$
10	1,0	9,0	$30 \times 10^8$

#### 6.5.1.3.2. Preparación de los Inóculos Bacterianos

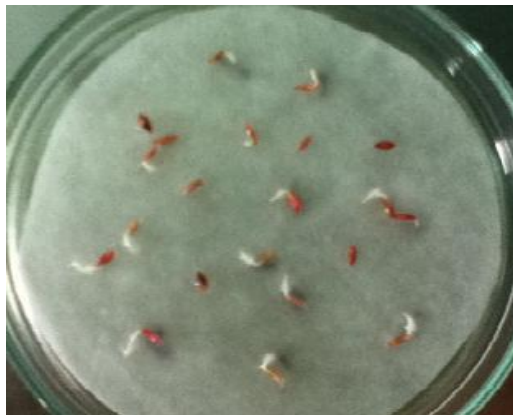
Para la preparación de los Inóculos de las 24 cepas de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno se preparó un caldo con la composición del medio Ashby para asegurar que el medio en donde van a desarrollarse las semillas de Lechuga esté libre de cualquier fuente de Nitrógeno mineral. Para ello, se dispuso de tubos de ensayos (3 para cada cepa), con aproximadamente 10 mL de caldo estéril. Se procedió a

inocular colonias jóvenes de cada una de las 24 cepas de Actinomiceto en estado exponencial de crecimiento, es decir, que las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido donde su incremento es exponencial respecto al tiempo. La inoculación se hace hasta obtener cualitativamente una turbidez en el medio acorde a la turbidez mostrada por la escala 0,5 de McFarland, para así establecer una concentración aproximada de los inóculos. Finalmente, para que el caldo inoculado tuviera una consistencia semisólida se suplementó con un 10% de agar-agar líquido estéril.

#### **6.5.1.4. Ensayo Inoculación de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno en semillas germinadas de Lechuga**

Al tener los Inóculos bacterianos dispuestos en los respectivos tubos de ensayo y otros más sin inóculo como blanco, se procedió a colocar en cada uno de ellos una semilla previamente desinfectada y germinada de Lechuga. En este caso, la germinación de las semillas duró 2 días y se escogieron plántulas que presentaran una radícula de 5 milímetros de longitud. Una vez dispuestas se realizaron revisiones periódicas hasta el día 5 de crecimiento, día en el cual se tomaron los registros finales del ensayo.

Durante la germinación el embrión de la semilla envía inicialmente un brote que se denomina radícula, la cual se convierte en la raíz primaria. Tras la salida de la radícula, emerge el hipocótilo elevando el apéndice de la plántula. El hipocótilo es el primer órgano de expansión y se desarrolla hasta formar el tallo, (Craviotto, 2003)



**Figura 13. Semillas de Lechuga a 2 días de germinación**



## 6.5.2. Resultados

### 6.5.2.1. Porcentaje Germinación de Semillas de Lechuga

Los resultados obtenidos en el montaje para la determinación del porcentaje de germinación de las 400 semillas seleccionadas, muestran que 308, lo cual representa el 77%, han superado efectivamente el estado de latencia es decir, superaron el periodo en el cual teniendo todas las condiciones óptimas de germinación no lograron hacerlo. Adicionalmente se observa como la desinfección con hipoclorito de Sodio no influye negativamente en la germinación de las mismas. A continuación en la Tabla 18 se aprecian los resultados de los 40 grupos de semillas cada una con un total de 10 individuos

**Tabla 12. Resultados Porcentaje de Germinación Semillas de Lechuga**

Semillas Germinadas (SG), Semillas No Germinadas (SNG)

REPETICIÓN	SG	SNG	REPETICIÓN	SG	SNG
1	9	1	21	8	2
2	8	2	22	7	3
3	6	4	23	9	1
4	7	3	24	6	4
5	7	3	25	6	4
6	6	4	26	8	2
7	8	2	27	9	1
8	8	2	28	8	2
9	9	1	29	7	3
10	9	1	30	8	2
11	8	2	31	9	1
12	6	4	32	7	3
13	8	2	33	7	3
14	9	1	34	8	2
15	7	3	35	6	4
16	6	4	36	9	1
17	7	3	37	9	1
18	9	1	38	7	3
19	8	2	39	9	1
20	7	3	40	9	1

### 6.5.2.2. Efecto de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno sobre el crecimiento de Lechuga

Transcurridos los 5 días en los que las semillas germinadas de lechuga crecieron bajo la influencia de las 24 cepas de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno, se realizó la evaluación del crecimiento midiendo la longitud en centímetros desde el hipocótilo hasta la radícula de las plántulas en crecimiento. Los resultados de esta medición se presentan en la Tabla 19. En el Anexo 4 se observa el montaje general de los inóculos bacterianos con las plántulas de lechuga así como el registro fotográfico del crecimiento de las semillas mediado por las 24 cepas de Actinomicetos.

**Tabla 13. Medida de longitud de plántulas de Lechuga crecidas bajo la influencia de Actinomicetos fijadores de Nitrógeno**

Cepa	Crecimiento Lechuga	Longitud 1 (cm)	Longitud 2 (cm)	Longitud 3 (cm)	Promedio (cm)
Lechuga sin inóculo (Blanco)		3.0	3.4	3.2	3.2
JBUTP_GEA_BS_A002		6.0	6.2	5.9	6.0
JBUTP_GEA_BS_A005		6.5	6.3	6.7	6.5
JBUTP_GEA_BS_A006		5.5	5.1	5.3	5.3
JBUTP_GEA_BS_A007		6.3	6.0	6.5	6.3
JBUTP_GEA_BS_A008		7.0	6.8	7.1	7.0
JBUTP_GEA_BS_A009		6.0	5.8	6.0	5.9
JBUTP_GEA_G_A012		5.0	4.8	5.3	5.0
JBUTP_GEA_G_A013		5.5	5.4	5.1	5.3
JBUTP_GEA_G_A014		6.6	6.3	6.5	6.5
JBUTP_GEA_H_A016		6.8	6.8	6.4	6.7
JBUTP_GEA_H_A017		6.0	6.3	6.0	6.1
JBUTP_GEA_H_A018		5.0	5.4	5.2	5.2
JBUTP_GEA_H_A019		4.0	4.3	4.1	4.1
JBUTP_GEA_H_A020		6.7	6.5	6.8	6.7
JBUTP_GEA_H_A022		5.0	5.4	5.2	5.2
JBUTP_GEA_BS_A024		4.0	4.1	4.4	4.2
JBUTP_GEA_BS_A025		6.0	6.3	6.0	6.1
JBUTP_GEA_G_A026		5.5	5.4	5.0	5.3
JBUTP_GEA_G_A027		4.5	4.5	4.2	4.4
JBUTP_GEA_G_A028		7.0	7.1	6.8	7.0
JBUTP_GEA_G_A029		6.8	6.5	6.7	6.7
JBUTP_GEA_G_A030		5.5	5.1	5.6	5.4
JBUTP_GEA_G_A031		4.5	4.6	4.3	4.5
JBUTP_GEA_G_A032		6.0	6.3	6.2	6.2

El análisis estadístico se realizó haciendo uso del paquete estadístico SPSS los cuales presentan distribución normal; haciendo uso de la prueba de ShapiroWilk se verificó la normalidad de los datos.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza ANOVA (Analysis Of VAriance, según terminología inglesa), para observar si existen diferencias estadísticamente significativas entre inóculos de actinomicetos en el crecimiento de las plántulas de lechuga, considerando las siguientes hipótesis estadísticas:

Ho = Si existe efecto de los actinomicetos en el crecimiento de las lechugas.

Ha= No existe efecto de los actinomicetos en el crecimiento de las lechugas.

El grado de significancia de los datos arroja un valor por debajo de 0.05 ( $P < 0.05$ ), lo que indica que Ho es verdadera, denotándose que existen diferencias estadísticamente significativas entre colonias afectando el crecimiento de las lechugas. En el anexo 4 se observa la tabla del análisis ANOVA.

Posteriormente, se realizó un análisis POSTANOVA por medio del método deDuncan para comparar todos los pares de medias y así agrupar las colonias según el efecto en el crecimiento de las plántulas de lechuga midiendo la longitud en centímetros desde el hipocótilo hasta la radícula de estas plántulas en crecimiento. Los Resultados de este análisis se presentan en el anexo 4 C. Análisis POSTANOVA

Con el fin de analizar detalladamente los resultados obtenidos en las agrupaciones arrojadas por medio del método estadístico de Duncan, en la Figura 14 se relacionan las cepas de cada agrupación con su respectivo género identificado y el crecimiento en longitud de las plántulas de lechuga bajo la influencia de cada una de ellas.

GRUPO 1			GRUPO 3		
CEPA	Longitud (cm)	Género	CEPA	Longitud (cm)	Género
JBUTP_GEA_BS_A024	4,067	Streptomyces	JBUTP_GEA_G_A030	5,400	Nocardia
JBUTP_GEA_H_A019	4,133	Streptomyces	JBUTP_GEA_H_A017	5,767	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A027	4,400	Streptomyces			
JBUTP_GEA_G_A031	4,467	Streptomyces			

GRUPO 2			GRUPO 4		
CEPA	Longitud (cm)	Género	CEPA	Longitud (cm)	Género
JBUTP_GEA_G_A012	5,033	Nocardia	JBUTP_GEA_H_A017	5,767	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A018	5,200	Streptomyces	JBUTP_GEA_BS_A009	5,933	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A022	5,200	Nocardia	JBUTP_GEA_BS_A002	6,033	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A006	5,300	Nocardia	JBUTP_GEA_BS_A025	6,100	Nocardia
JBUTP_GEA_G_A026	5,300	Streptomyces	JBUTP_GEA_G_A032	6,167	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A013	5,333	Nocardia			
JBUTP_GEA_G_A030	5,400	Nocardia			

(a)

GRUPO 5			GRUPO 6		
CEPA	Longitud (cm)	Género	CEPA	Longitud (cm)	Género
JBUTP_GEA_BS_A009	5,933	Streptomyces	JBUTP_GEA_BS_A025	6,100	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A002	6,033	Nocardia	JBUTP_GEA_G_A032	6,167	Streptomyces
JBUTP_GEA_BS_A025	6,100	Nocardia	JBUTP_GEA_BS_A007	6,267	Nocardia
JBUTP_GEA_G_A032	6,167	Streptomyces	JBUTP_GEA_G_A014	6,467	Nocardia
JBUTP_GEA_BS_A007	6,267	Nocardia	JBUTP_GEA_BS_A005	6,500	Nocardia

GRUPO 7			GRUPO 8		
CEPA	Longitud (cm)	Género	CEPA	Longitud (cm)	Género
JBUTP_GEA_BS_A007	6,267	Nocardia	JBUTP_GEA_H_A016	6,667	Nocardia
JBUTP_GEA_G_A014	6,467	Nocardia	JBUTP_GEA_H_A020	6,667	Streptomyces
JBUTP_GEA_BS_A005	6,500	Nocardia	JBUTP_GEA_G_A029	6,667	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A016	6,667	Nocardia	JBUTP_GEA_BS_A008	6,967	Streptomyces
JBUTP_GEA_H_A020	6,667	Streptomyces	JBUTP_GEA_G_A028	6,967	Streptomyces
JBUTP_GEA_G_A029	6,667	Streptomyces			

(b)

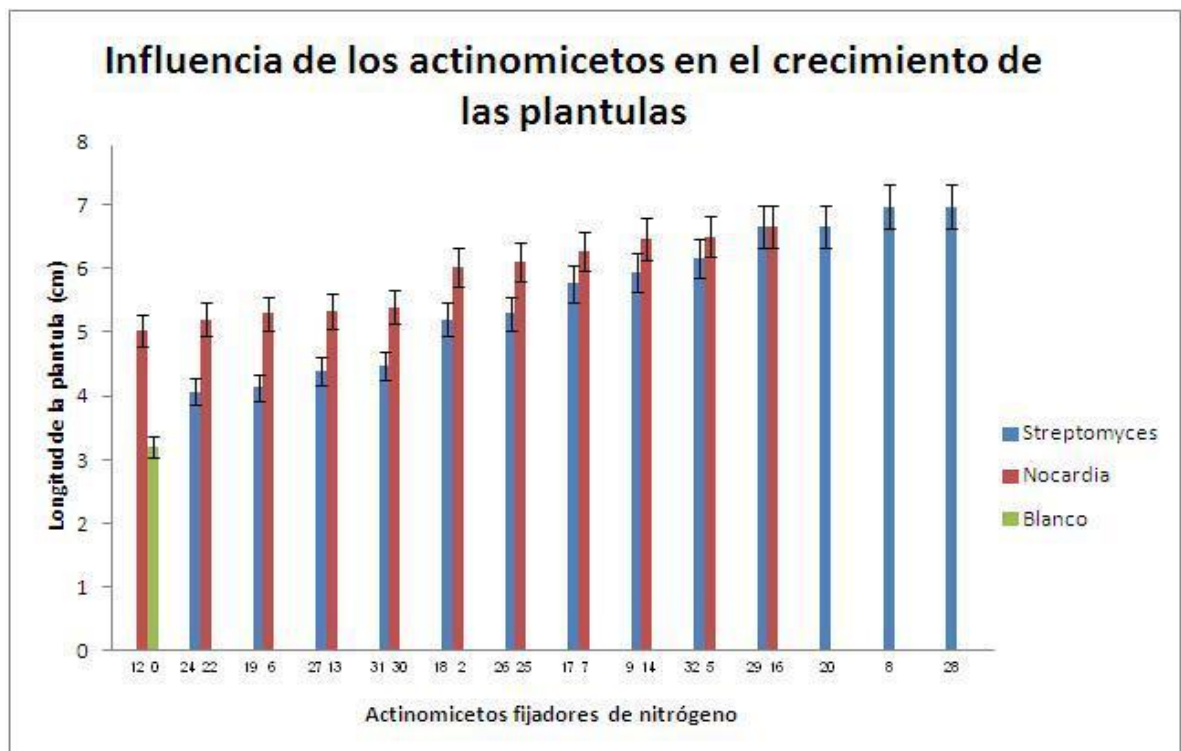
**Figura 14. Agrupaciones de Cepas según su impacto en el crecimiento de plántulas de lechuga.** (a), Tablas correspondientes a los grupos 1 al 4; (b) Tablas correspondientes a los grupos 5 a 8.

Como se puede apreciar las cepas que conforman los grupos 6, 7 y 8 son las que influyeron en mayor proporción el crecimiento longitudinal de las plántulas de lechuga desde el hipocótilo hasta la radícula, por lo cual se presume que éstas presentan un mayor potencial como promotores del crecimiento vegetal.

Esta promoción del crecimiento se da por factores como fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos o producción de hormonas, (Cerrato, 2007), por lo que este ensayo evalúa el potencial de los Actinomicetos como promotores del crecimiento vegetal.

Pero, al considerar que las plántulas de lechuga requieren para su desarrollo cantidades apreciables de Nitrógeno, (Hernández, J., 2009), nos da un indicio de que esta promoción se da en gran medida a una Fijación de Nitrógeno.

A continuación, en la figura 15, se observa la influencia de los actinomicetos fijadores de nitrógeno según género en el crecimiento de plántulas de lechuga.



**Figura 15. Influencia de los actinomicetos fijadores de nitrógeno en el crecimiento de plántulas de lechuga.** 0, blanco; 2, JBUTP\_GEA\_BS\_A002; 5,

JBUTP\_GEA\_BS\_A005; 6, JBUTP\_GEA\_BS\_A006; 7, JBUTP\_GEA\_BS\_A007; 8, JBUTP\_GEA\_BS\_A008; 9, JBUTP\_GEA\_BS\_A009; 12, JBUTP\_GEA\_G\_A012; 13, JBUTP\_GEA\_G\_A013; 14, JBUTP\_GEA\_G\_A014; 16, JBUTP\_GEA\_H\_A016; 17, JBUTP\_GEA\_H\_A017; 18, JBUTP\_GEA\_H\_A018; 19, JBUTP\_GEA\_H\_A019; 20, JBUTP\_GEA\_H\_A020; 22, JBUTP\_GEA\_H\_A022; 24, JBUTP\_GEA\_BS\_A024; 25, JBUTP\_GEA\_BS\_A025; 26, JBUTP\_GEA\_G\_A026; 27, JBUTP\_GEA\_G\_A027; 28, JBUTP\_GEA\_G\_A028; 29, JBUTP\_GEA\_G\_A029; 30, JBUTP\_GEA\_G\_A030; 31, JBUTP\_GEA\_G\_A031; 32, JBUTP\_GEA\_G\_A032

Las 24 colonias de actinomicetos identificadas como posibles fijadores de nitrógeno presentaron potencial como promotores del crecimiento vegetal. De forma general se evidencia una diferencia significativa en la longitud de crecimiento de las plántulas sin inóculo respecto a la longitud de crecimiento influenciado por estos microorganismos. Estas diferencias en el impacto que ejerce cada una de las cepas, puede ser debido a las actividades biológicas que estas ejercen.

Como se puede apreciar en la Figura 15, las cepas identificadas dentro del género *Streptomyces* comparadas con las cepas del género *Nocardia*, son las que presentan más variedad en el impacto del crecimiento, siendo de éste género las cepas con mayor promoción. Mientras que cepas pertenecientes al género *Nocardia* evidencian un comportamiento más uniforme. Esto es debido a la producción de metabolitos secundarios, enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasa, nitrogenasa por parte de *Streptomyces* ,(Tohme, 2000).

Teniendo en cuenta que las plántulas que no fueron inoculadas alcanzaron en promedio un crecimiento de 3,2 cm y considerando, a modo de ejemplo que las plántulas bajo la influencia de las cepas JBUTP\_GEA\_BS\_A008 y JBUTP\_GEA\_G\_A028 alcanzaron en promedio un crecimiento de 6,97 cm cada una, se evidencia un incremento en el crecimiento de 3,77cm En la Tabla 21 se presenta el incremento de la longitud de las plántulas de lechuga inoculadas por efecto de las cepas en estudio, (Diaz, 2001).

**Tabla 14. Influencia de actinomicetos fijadores de nitrógeno sobre plántulas de lechuga**

<b>Cepa</b>	<b>Longitud plántula (cm)</b>	<b>Incremento longitudinal respecto al blanco (cm)</b>
JBUTP_GEA_BS_A002	6,03	2,83
JBUTP_GEA_BS_A005	6,50	3,3
JBUTP_GEA_BS_A006	5,30	2,1
JBUTP_GEA_BS_A007	6,27	3,07
JBUTP_GEA_BS_A008	6,97	<b>3,77</b>
JBUTP_GEA_BS_A009	5,93	2,73
JBUTP_GEA_G_A012	5,03	1,83
JBUTP_GEA_G_A013	5,33	2,13
JBUTP_GEA_G_A014	6,47	3,27
JBUTP_GEA_H_A016	6,67	3,47
JBUTP_GEA_H_A017	5,77	2,57
JBUTP_GEA_H_A018	5,20	2
JBUTP_GEA_H_A019	4,13	0,93
JBUTP_GEA_H_A020	6,67	3,47
JBUTP_GEA_H_A022	5,20	2
JBUTP_GEA_BS_A024	4,07	0,87
JBUTP_GEA_BS_A025	6,10	2,9
JBUTP_GEA_G_A026	5,30	2,1
JBUTP_GEA_G_A027	4,40	1,2
JBUTP_GEA_G_A028	6,97	<b>3,77</b>
JBUTP_GEA_G_A029	6,67	3,47
JBUTP_GEA_G_A030	5,40	2,2
JBUTP_GEA_G_A031	4,47	1,27
JBUTP_GEA_G_A032	6,17	2,97

El efecto en el crecimiento de las plántulas que fueron inoculadas con las 24 cepas de Actinomicetos aislados e identificados se compararon con el crecimiento longitudinal de las plántulas sin inóculos, observándose que 4 cepas (JBUTP\_GEA\_BS\_A024, JBUTP\_GEA\_H\_A019, JBUTP\_GEA\_G\_A027, JBUTP\_GEA\_G\_A031) presentan incremento promedio de 1,1cm; 13 cepas (JBUTP\_GEA\_BS\_A002, JBUTP\_GEA\_BS\_A006, JBUTP\_GEA\_BS\_A007, JBUTP\_GEA\_BS\_A009,

JBUTP\_GEA\_G\_A012, JBUTP\_GEA\_G\_A013,  
JBUTP\_GEA\_H\_A017,JBUTP\_GEA\_H\_A018, JBUTP\_GEA\_H\_A022,  
JBUTP\_GEA\_BS\_A025, JBUTP\_GEA\_G\_A026, JBUTP\_GEA\_G\_A030,  
JBUTP\_GEA\_G\_A032) presentan un incremento superior a 2,4cm y 7 cepas  
(JBUTP\_GEA\_BS\_A005, JBUTP\_GEA\_BS\_A008, JBUTP\_GEA\_G\_A014,  
JBUTP\_GEA\_H\_A016, JBUTP\_GEA\_H\_A020, JBUTP\_GEA\_G\_A028,  
JBUTP\_GEA\_G\_A029) un incremento de 3,5cm superior a las plántulas sin inoculo.

Las colonias JBUTP\_GEA\_BS\_A008 y JBUTP\_GEA\_G\_A028 anteriormente mencionadas, son las que presentaron un mayor potencial como promotores del crecimiento al ser las que lograron promover en mayor proporción el crecimiento de las plántulas de lechuga, 3,77cm. Ambas colonias pertenecen al género *Streptomyces*. La colonia JBUTP\_GEA\_BS\_A024 identificada también como perteneciente al género *Streptomyces* es la que presentó un menor incremento en la longitud de las plántulas 0,87cm considerando así, que esta cepa posee un menor potencial como promotor de crecimiento.

Estos incrementos en la longitud de las plántulas de lechuga que denotan la influencia de las cepas, presentan valores muy variados debidos a la producción que ejerce cada una de ellas de metabolitos secundarios, compuestos represores de tumores, enzimas y vitaminas, con las cuales son capaces de ejercer una posible fijación de nitrógeno, (Tohme, 2000).



## 7. CONCLUSIONES

- Se logró la obtención de 24 cepas de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno. Nueve (9) de ellas fueron aisladas directamente de los suelos del JBUTP en medio de cultivo selectivo libre de Nitrógeno (Medio Ashby). Las quince (15) restantes provienen de la caracterización como Fijadores de Nitrógeno de cepas de Actinomicetos aisladas por el grupo de estudio GEA.
- Las 24 cepas de Actinomicetos aparte de poseer la característica de ser Fijadoras de Nitrógeno tienen en común el sitio de su procedencia, porque tanto las colonias que fueron aisladas en este trabajo de investigación como las colonias que fueron suministradas por el grupo GEA, fueron aisladas del suelo del JBUTP. Relacionando cepas con el respectivo ecosistema de su aislamiento, se observa que ocho (8) cepas provienen del ecosistema Bosque Secundario, diez (10) cepas de Guadual y seis (6) de Humedal.
- Los 24 Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno fueron identificados en género siguiendo criterios morfológicos al comprar microscópicamente el micelio aéreo que estas cepas generan con micelios de referencia que se encuentran reportados en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Se identificaron 13 cepas como pertenecientes al género *Streptomyces* y 11 restantes al género *Nocardia*.
- En los suelos del ecosistema Bosque Secundario se identificaron 3 cepas del género *Streptomyces* y 5 cepas del género *Nocardia*. En el ecosistema Guadual se lograron identificar 6 cepas del género *Streptomyces* y 4 cepas del género *Nocardia*. Finalmente, en el ecosistema Humedal fueron aisladas 4 cepas del género *Streptomyces* y 2 cepas del género *Nocardia*.
- Las 24 cepas de actinomicetos clasificadas como posibles fijadores de nitrógeno, presentaron potencial como promotores del crecimiento vegetal al ser evaluado su accionar sobre el desarrollo de plántulas de lechuga. Se evidenció una diferencia estadísticamente significativa en la longitud de crecimiento de plántulas con inóculo respecto al crecimiento de plántulas sin inóculo.

- 4 de las 24 cepas de actinomicetos fijadores de nitrógeno (JBUTP\_GEA\_BS\_A024, JBUTP\_GEA\_H\_A019, JBUTP\_GEA\_G\_A027, JBUTP\_GEA\_G\_A031) presentan un incremento promedio en su crecimiento de 1,1cm; 13 cepas (JBUTP\_GEA\_BS\_A002, JBUTP\_GEA\_BS\_A006, JBUTP\_GEA\_BS\_A007, JBUTP\_GEA\_BS\_A009, JBUTP\_GEA\_G\_A012, JBUTP\_GEA\_G\_A013, JBUTP\_GEA\_H\_A017, JBUTP\_GEA\_H\_A018, JBUTP\_GEA\_H\_A022, JBUTP\_GEA\_BS\_A025, JBUTP\_GEA\_G\_A026, JBUTP\_GEA\_G\_A030, JBUTP\_GEA\_G\_A032) presentan un incremento superior a 2,4cm y 7 cepas (JBUTP\_GEA\_BS\_A005, JBUTP\_GEA\_BS\_A008, JBUTP\_GEA\_G\_A014, JBUTP\_GEA\_H\_A016, JBUTP\_GEA\_H\_A020, JBUTP\_GEA\_G\_A028, JBUTP\_GEA\_G\_A029) un incremento de 3,5cm.

## 8. RECOMENDACIONES

- Considerando que el aislamiento de microorganismos en medios libre de nitrógeno (Medio Ashby), constituye un primer paso hacia la identificación de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno, se debe realizar una comprobación de esta actividad en las 24 cepas de Actinomicetos aislados mediante ensayos como el de la actividad nitrogenasa al analizar la capacidad de reducir acetileno a etileno.
- Realizar identificación hasta especie de las 24 cepas en estudio identificadas como pertenecientes a los géneros *Streptomyces* y *Nocardia*.
- Realizar ensayos de inoculación en conjunto con las cepas JBUTP\_GEA\_BS\_A008 y JBUTP\_GEA\_G\_A028 las cuales evidenciaron la más alta influencia en la promoción del crecimiento de las plántulas de lechuga.

## BIBLIOGRAFÍA

Adesemoye A.O., Kloepper, J.W. 2009. "Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency "Applied Microbiology And Biotechnology ISSN: 0175-7598 ed: Springer, v.85 fasc. p.1 - 12 ,2009.

Bailón, L; Golzález, R; Cervantes, A; 2003. Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Universidad Autónoma de México. Facultad de Estudios superiores Zaragoza.

Bergey,2005. Manual of Systematic Bacteriology.

Cerda, M. 2008. Aislamiento de *Micromonospora* de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Genética. Tesis Doctoral.

Cerrato R 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícola y ambientales. Editorial Trillas, México. pp. 170-224.

Craviotto, R; Arango, M, 2003. Informe Técnico 'La Calidad contada por la propia semilla'. Instituto Nacional Técnico Agropecuario. Córdoba, Argentina.

Crawford, DL, JM Lynch, JM Whipps, y Ousley MA,1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen.

Cuervo, J, 2010. Aislamiento y Caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de Nitrógeno y Solubilizadores de Fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá, Colombia.

Dalton, D.A & S. Kramer. 2006. Plant-Associated Bacteria, p. 105-130. In S. S. Gnanamanickam (ed.). Nitrogenfixing bacteria in non-legumes. Springer, Dordrecht, Holanda.

Diaz, 2001. Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce

Disalvo, A, 2009 Microbiology And Immunology, University of South Carolina School of Medicine.

Dworkin, M, 2006. Editor en jefe. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Vol.3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer Science+Business Media, LLC.

Franco- Correa, 2010. Aislamiento y caracterización de *bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos biofertilizantes comerciales.

Franco, M, 2008. Assessment of characters PGPR in Actinomycetes and interactions of these Rhizobacteria with mycorrhizalfungi. University of Granada. Department of Plant Physiology. Doctoral Thesis.

Germida J, 1993. Cultural methods for soil microorganisms. In: Soil sampling and methods of analysis. M. R. Carter editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers 263-275p.

Hernández, J; Espinosa J, 2009. Guía Técnica para la producción del cultivo de la Lechuga. Instituto de Investigaciones Hortícolas 'Liliana Dimitrova'. Asociación cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba.

MacFaddin, 2000. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 3th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Estados Unidos.

Mackenzie, G; Rodríguez, F; 1996. Aislamiento, Patrón de Fermentación de Carbohidratos y Caracterización Morfológica de Bacterias Celulolíticas del Rumen de Bovinos Alimentados con Heno de Raigrás en Colombia. Revista Corpoica Vol. 1, N° 1. Bogotá, Colombia.

Madigan T.M, 2004. Brock-Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Editions Pearson Education. 150p.

Mantilla A, 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana.

MCD LAB, 2008. Especificación de Producto: Caldo Rojo de Fenol y Sacarosa. MCD LAB S.A. de C.V. Blv. Centro Industrial N° 1017, Tlalnepantla, Edo. De México.

Montesinos, E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control.

Muller, G., Matzanke BF, y Raymond KN. 1984. El transporte de hierro en *Streptomyces pilosus* mediada por sideróforos ferricromo

Olivares 2008. Fijación Biológica de Nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada, España.

OMS, 2004. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. CDS Centro de Recursos de Información OMS. Ginebra Suiza.

Ospina, B; Dossman M; 2011. Plan de manejo ambiental del Jardín Botánico de los bosques de la Universidad Tecnológica de Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ciencias Ambientales. Administración Ambiental. Pereira, Colombia.

Pérez, S; Torralba, A.; 1997.-La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. 21 pp.

Priest, F; Austin, B; 1993. Modern bacterial taxonomy. Chapman & Hall

Ramírez, L 2000. Manual de Microbiología. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. Pereira, Colombia.

Redondo-Nieto, 2006. Relación B-Ca<sup>+2</sup> en la Fijación Biológica del Nitrógeno. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

Rodríguez, 2011. Evaluación de Etapas del proceso productivo de un Bioinsumo dirigido a la degradación de materiales orgánicos y regulación sanitaria de cultivos. Universidad Católica de Manizales. Manizales, Colombia.

Rodríguez, B. Sevillano, G. Subramaniam P. 2000. La Fijación de Nitrógeno Atmosférico, una biotecnología en la producción agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Edición electrónica CeresNet. Salamanca, España.

Rodríguez Barrueco, C; Sevillano García, F; Subramaniam, P. 2009. La fijación del nitrógeno atmosférico.

Schlatter, V. Gerding. 1995. Método de clasificación de sitios para la producción forestal.

Stanley, 1994. The Family Streptomycetaceae. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore USA.

Sylvia D.M, 1999. Principles and applications of soil microbiology. United States of America. Hall Inc. 480p.

Torralba – Pérez 1997. La fijación de Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal. Facultad de Biología. Oviedo, España.

Uzcasteguí - Negrón, 2009. Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: Un estudio fenotípico comparativo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.

Vargas, P; Ferrera R, 2001. Inoculación de Bacterias promotoras de crecimiento en Lechuga. TERRA Latinoamericana, Vol. 19, número 004. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 327-335

Yuan, WM, y DL Crawford. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Medios de Cultivo

#### 1. Medio Ashby

COMPONENTES	g/L
Sacarosa	20
CaCl <sub>2</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub>	0.2
FeSO <sub>4</sub>	0.005
NaCl	0.2
Agar-Agar	15

Agregar los componentes al agua destilada. Calentar hasta ebullición 5 min y Autoclavar (15lb y 121°C). Servir en cajas de petri estériles.

### ANEXO 2. Reporte del conteo Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/g en medio Ashby.

Ponderado del conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g) de cada una de las 7 muestras de suelo:

#### Bosque Secundario Intervenido. Conteo diario UFC/g. Medio Ashby

Dilución Día	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
<b>4</b>	676	458	260	16	1	0	0	0	0
<b>5</b>	Incontable	490	367	26	3	0	0	0	0
<b>6</b>	Incontable	Incontable	386	27	3	0	0	0	0
<b>7</b>	Incontable	Incontable	386	27	4	1	1	0	0
<b>12</b>	Incontable	Incontable	446	36	6	2	1	1	1
<b>13</b>	Incontable	Incontable	442	38	6	2	1	1	1
<b>14</b>	Incontable	Incontable	442	41	6	2	1	1	1
<b>15</b>	Incontable	Incontable	416	42	6	2	1	1	1



**Bosque Secundario Poco Intervenido. Conteo diario UFC/g. Medio Ashby**

<b>Dilución Día</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>4</b>	Incontable	201	78	8	0	0	0	0	0
<b>5</b>	Incontable	284	105	17	1	1	0	0	0
<b>6</b>	Incontable	Incontable	128	19	19	1	0	0	0
<b>7</b>	Incontable	Incontable	137	21	8	1	1	1	0
<b>12</b>	Incontable	Incontable	176	25	4	2	2	2	0
<b>13</b>	Incontable	Incontable	191	27	4	2	2	2	0
<b>14</b>	Incontable	Incontable	204	27	4	2	2	2	0
<b>15</b>	Incontable	Incontable	160	22	4	2	2	2	0

**Bosque Secundario No Intervenido. Conteo diario UFC/g. Medio Ashby**

<b>Dilución Día</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>4</b>	Incontable	Incontable	443	62	1	0	0	0	0
<b>5</b>	Incontable	Incontable	498	63	1	1	0	0	0
<b>6</b>	Incontable	Incontable	622	65	1	1	0	0	0
<b>7</b>	Incontable	Incontable	643	67	1	1	0	0	0
<b>12</b>	Incontable	Incontable	752	75	3	1	0	0	0
<b>13</b>	Incontable	Incontable	Inc	77	3	3	0	0	0
<b>14</b>	Incontable	Incontable	Inc	69	3	3	0	0	0
<b>15</b>	Incontable	Incontable	Inc	62	3	2	0	0	0

**Guadual densidad alto-plano. Conteo diario UFC/g. Medio Ashby**

<b>Dilución Día</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>4</b>	Incontable	Incontable	37	3	0	0	0	0	0
<b>5</b>	Incontable	Incontable	43	5	1	1	0	0	0
<b>6</b>	Incontable	Incontable	45	6	1	1	0	0	0
<b>7</b>	Incontable	Incontable	46	6	1	1	0	0	0
<b>12</b>	Incontable	Incontable	50	8	1	1	0	0	0
<b>13</b>	Incontable	Incontable	54	8	1	1	0	0	0
<b>14</b>	Incontable	Incontable	55	8	1	1	0	0	0
<b>15</b>	Incontable	Incontable	60	8	1	1	0	0	0

**Guadual densidad baja-inclinado. Conteo diario UFC/g. Medio Ashby**

<b>Dilución Día</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>4</b>	Incontable	Incontable	93	6	2	0	0	0	0
<b>5</b>	Incontable	Incontable	100	6	3	0	0	0	0
<b>6</b>	Incontable	Incontable	106	6	3	0	0	0	0
<b>7</b>	Incontable	Incontable	107	7	4	1	0	0	0
<b>12</b>	Incontable	Incontable	107	7	4	1	0	0	0
<b>13</b>	Incontable	Incontable	122	8	4	1	0	0	0
<b>14</b>	Incontable	Incontable	124	9	6	1	0	0	0
<b>15</b>	Incontable	Incontable	141	9	3	1	0	0	0


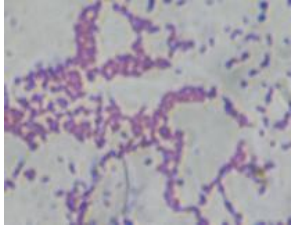

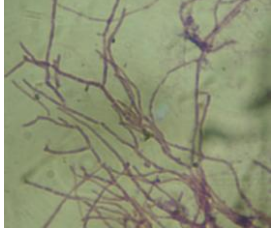

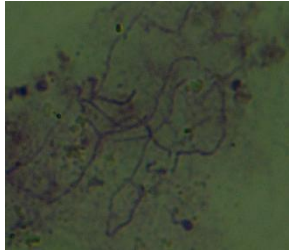
**Guadual densidad alta-inclinado. Conteo diario UFC/g. Medio Ashby**

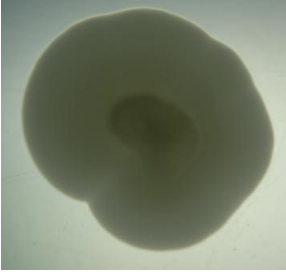
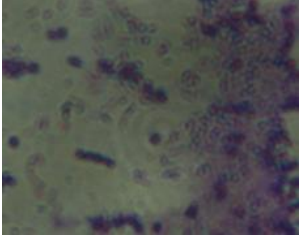

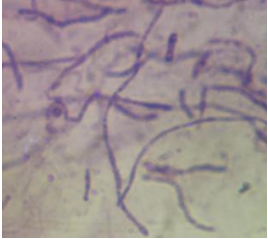

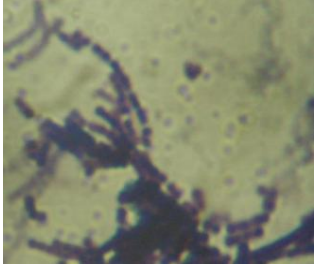
<b>Dilución Día</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>4</b>	Incontable	Incontable	45	7	0	0	0	0	0
<b>5</b>	Incontable	Incontable	50	10	1	1	1	1	0
<b>6</b>	Incontable	Incontable	52	14	1	1	1	1	0
<b>7</b>	Incontable	Incontable	56	13	2	1	1	1	0
<b>12</b>	Incontable	Incontable	60	13	2	1	1	1	0
<b>13</b>	Incontable	Incontable	63	13	2	1	1	1	0
<b>14</b>	Incontable	Incontable	66	13	2	1	1	1	0
<b>15</b>	Incontable	Incontable	68	12	2	1	1	1	0

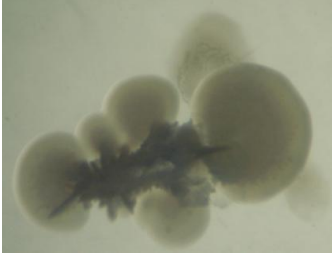
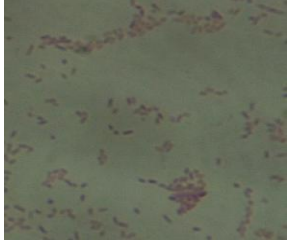
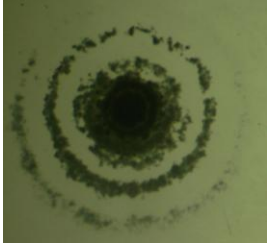
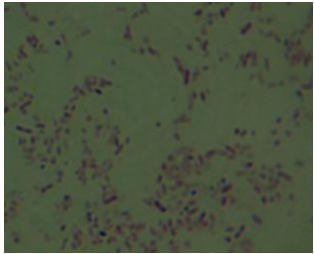

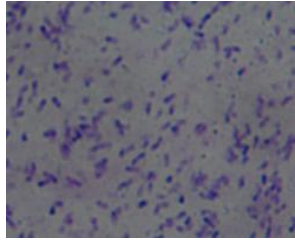
**Humedal. Conteo diario UFC/g. Medio Ashby**

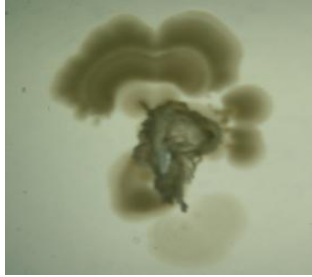
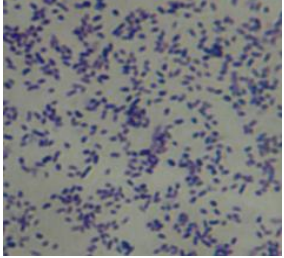

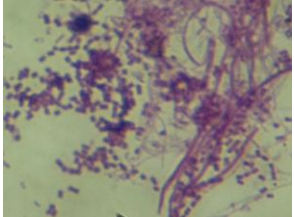
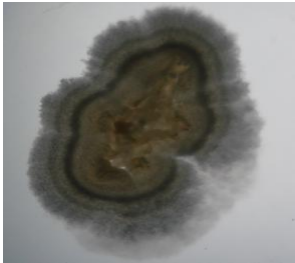
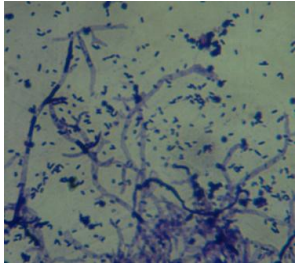
<b>Dilución Día</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>4</b>	102	33	21	1	1	0	0	0	0
<b>5</b>	216	56	41	1	1	0	0	0	0
<b>6</b>	241	83	43	1	1	0	0	0	0
<b>7</b>	Incontable	86	47	1	1	1	1	0	0
<b>12</b>	Incontable	Incontable	74	2	1	1	1	0	0
<b>13</b>	Incontable	Incontable	93	2	1	1	1	0	0
<b>14</b>	Incontable	Incontable	101	2	2	1	1	0	0
<b>15</b>	Incontable	Incontable	98	1	1	1	1	0	0



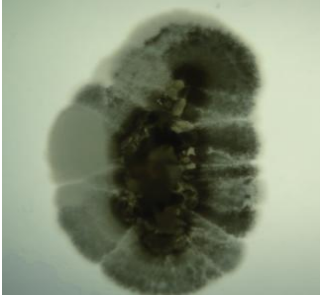

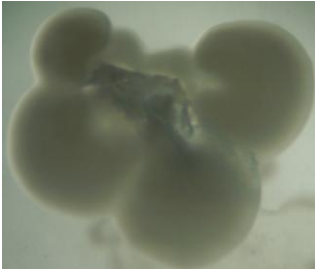
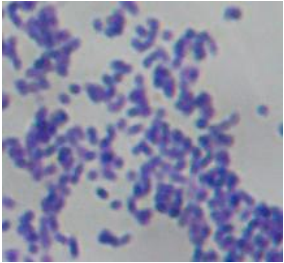
**ANEXO 3. Resumen Fotográfico de las Características Macroscópicas y Microscópicas de los actinomicetos Fijadores de Nitrógeno.**


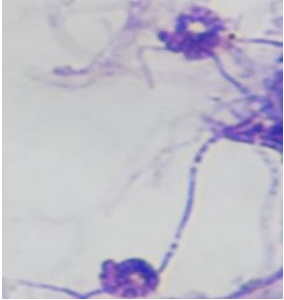
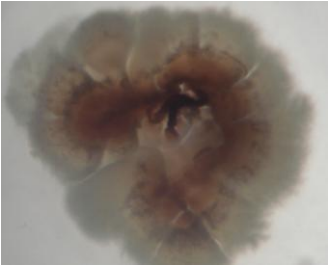
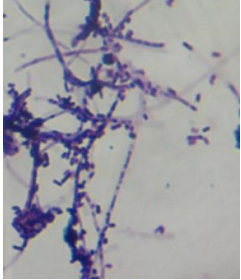
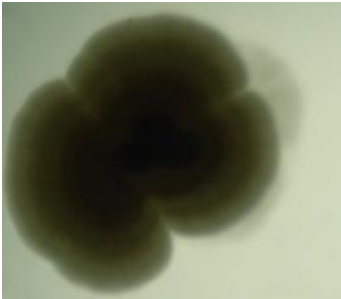
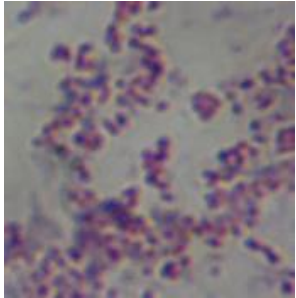
Cepa	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
JBUTP_GEA_BS_A002		 <p data-bbox="1110 772 1446 842">Agrupaciones de cocos Gram +</p>
JBUTP_GEA_BS_A005	 <p data-bbox="675 1087 1060 1226">Colonia seca de color café, forma irregular bordes redondeados no uniforme café claro</p>	 <p data-bbox="1110 1129 1446 1226">Micelio no fragmentado cadenas largas de Streptococos Gram +</p>
JBUTP_GEA_BS_A006	 <p data-bbox="688 1562 1047 1698">Colonia seca de color amarillo, adherida al agar Borde redondeado uniforme</p>	 <p data-bbox="1094 1583 1459 1656">Cadenas largas séptadas cocos, Gram +</p>

<p>JBUTP_GEA_BS_A007</p>	 <p>Colonia blanca circular con centro de coloración amarilla bordes redondeados no uniformes</p>	 <p>Cadenas de Streptococos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_BS_A008</p>	 <p>Colonia café seca, filamentosa, adherida al agar. Bordes redondeados no uniformes</p>	 <p>Micelio no fragmentado cadenas de Streptococos, Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_BS_A009</p>	 <p>Colonia café circular filamentosa con halo. Borde redondeado, adherida al agar</p>	 <p>Cadenas de Streptococos Gram +</p>

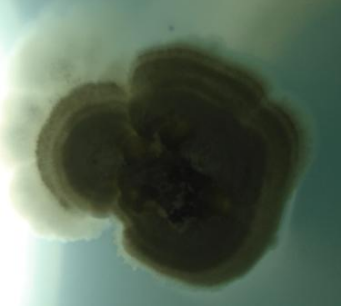
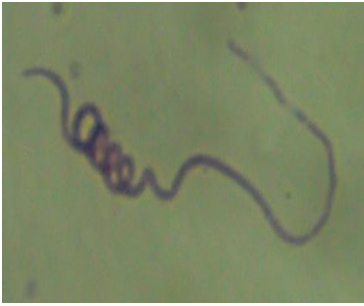

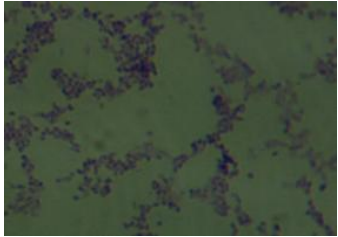

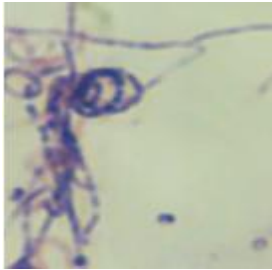
<p>JBUTP_GEA_G_A012</p>	 <p>Colonia seca, sin pigmento difusible en el medio, Forma irregular. reverso gris, adverso blanca</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_G_A013</p>	 <p>Colonia seca de color café, centro café oscuro Forma circular, presenta dos halos del mismo color.</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_G_A014</p>	 <p>Colonia seca filamentosa, adherida al agar adverso naranja, reverso amarillo. Bordes redondeados no uniformes</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>

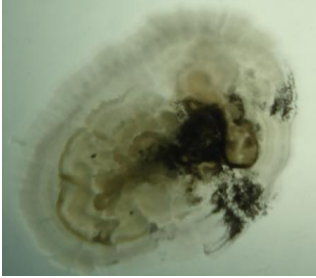
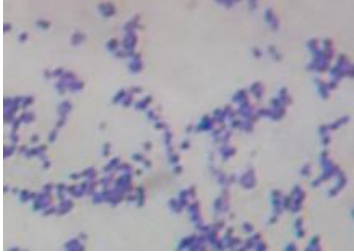

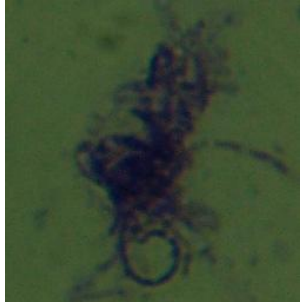
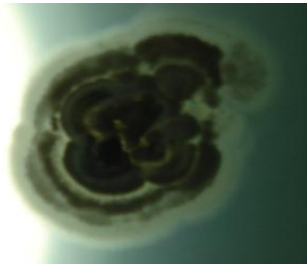
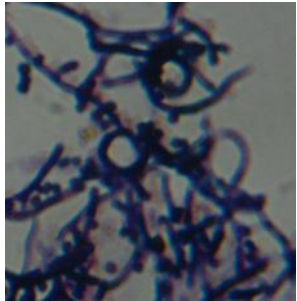
<p>JBUTP_GEA_H_A016</p>	 <p>Colonia seca, adherida al agar, adverso café, reverso blanco. Forma inconsistente, bordes redondeados no uniformes</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_H_A017</p>	 <p>Colonia eca, sin pigmento difusible en el medio, forma irregular, borde irregular</p>	 <p>Micelio no fragmentado Cadenas de Streptococos, Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_H_A018</p>	 <p>Colonia café seca filamentosa, adherida al agar, reverso gris, anverso café, borde filamentoso de color gris</p>	 <p>Micelio fragmentado Cocos, Gram +</p>

<p>JBUTP_GEA_H_A019</p>	 <p>Colonia blanca seca, forma circular. Reverso blanca, anverso beige. Centro circular de color café</p>	 <p>Cadena de Streptococos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_H_A020</p>	 <p>Colonia seca café, forma irregular. Borde ondulado no uniforme</p>	 <p>Cadena de Streptococos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_H_A022</p>	 <p>Colonia cremosa, sin pigmento difusible en el medio. Forma irregular, bordes redondeados</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>

<p>JBUTP_GEA_BS_A024</p>	 <p>Colonia café seca, forma irregular. Borde redondeado no uniforme</p>	 <p>Cadenas de Streptococos, Gram + Presencia de conidios.</p>
<p>JBUTP_GEA_BS_A025</p>	 <p>Colonia amarilla seca filamentosa. Adherida al agar. Reverso gris, averso amarillo. Borde filamentoso gris</p>	 <p>Cadenas no fragmentadas de Streptococos Poca presencia de conidios, Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_G_A026</p>	 <p>Colonia café seca, adherida al agar Forma irregular, borde redondeado no uniforme</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>

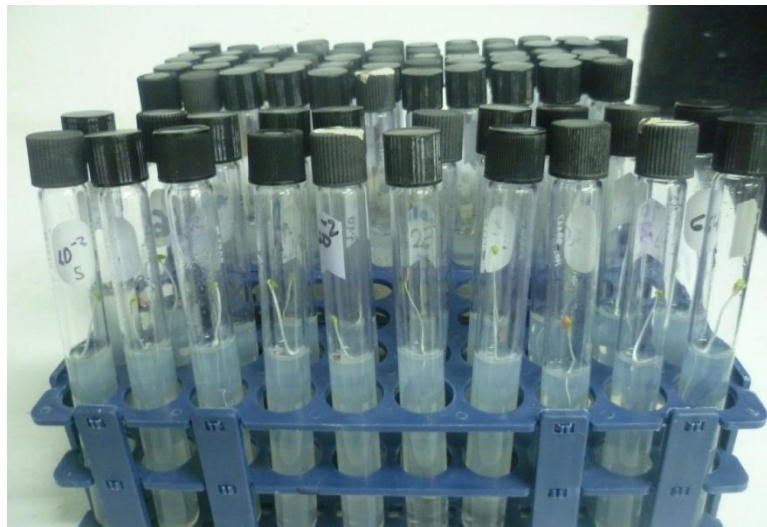


<p>JBUTP_GEA_G_A027</p>	 <p>Colonia café seca, adherida al agar forma irregular, borde redondeado no uniforme</p>	 <p>Micelio no fragmentado, espirales. Cadena de Streptococos, Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_G_A028</p>	 <p>Colonia café seca, pigmento no difusible en el medio. Forma irregular, borde redondeado no uniforme</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_G_A029</p>	 <p>Colonia café seca, adherida al agar Forma irregular, borde redondeado no uniforme</p>	 <p>Cadenas de Streptococos, Gram + Micelio fragmentado con espirales</p>


<p>JBUTP_GEA_G_A030</p>	 <p>Colonia amarilla seca, adherida al agar. Forma circular. Borde filamentosos. Adverso amarillo, reverso gris</p>	 <p>Agrupaciones de cocos Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_G_A031</p>	 <p>Colonia café seca, adherida al agar. Forma irregular, borde redondeada no uniforme.</p>	 <p>Micelio fragmentado, espiral. Cadenas de Streptococos, Gram +</p>
<p>JBUTP_GEA_G_A032</p>	 <p>Colonia café seca, adherida al agar. Forma irregular, borde redondeado no uniforme</p>	 <p>Micelio fragmentado con espirales. Presencia de conidios. Cadenas de Streptococos, Gram +</p>





**ANEXO 4. Evaluación *in-vitro* del efecto de los Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno sobre el desarrollo de plantas de Lechuga**

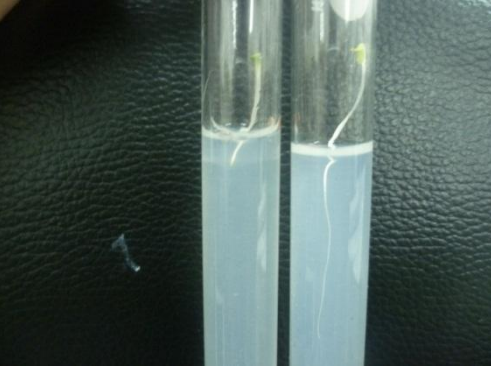
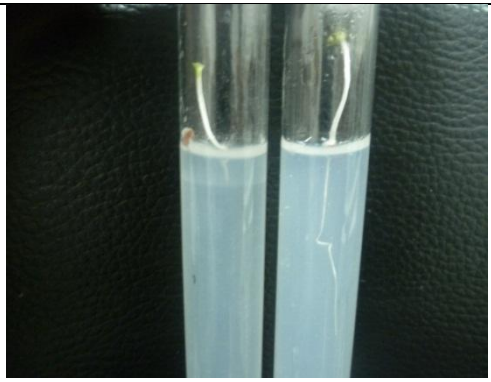
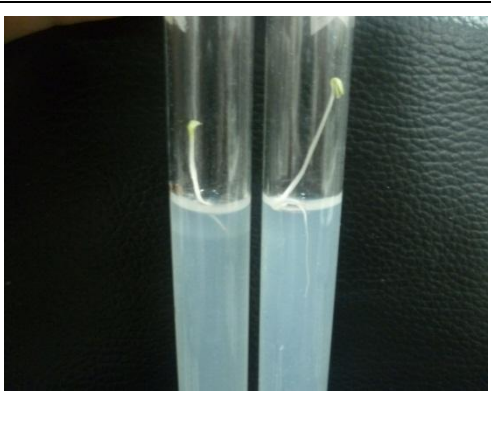
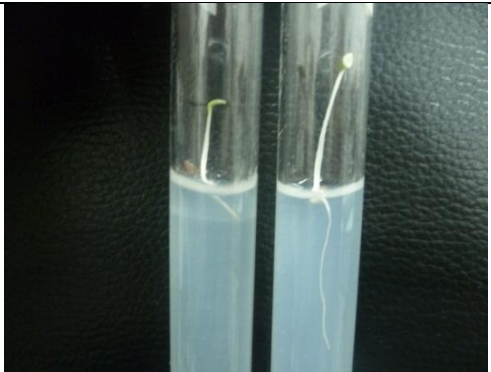
1. Montaje general tubos de ensayo con Inóculos bacterianos y plántulas de Lechuga

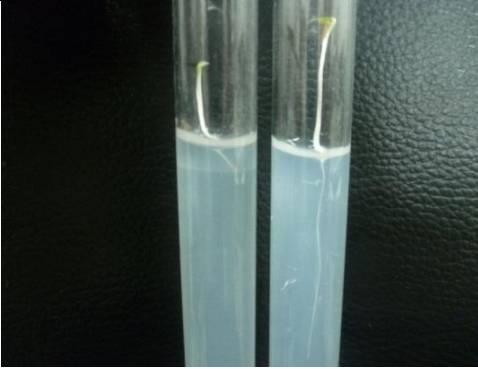
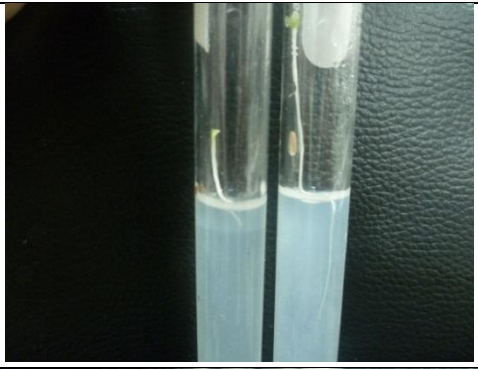
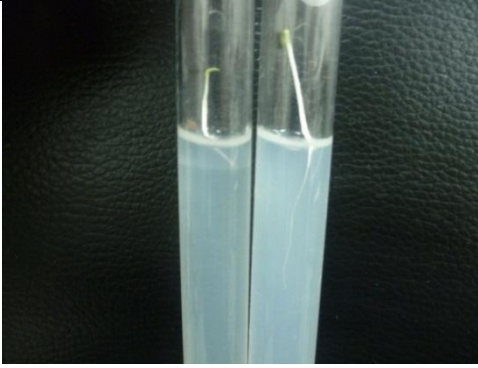
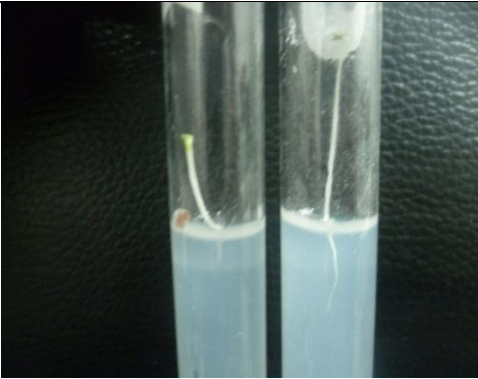


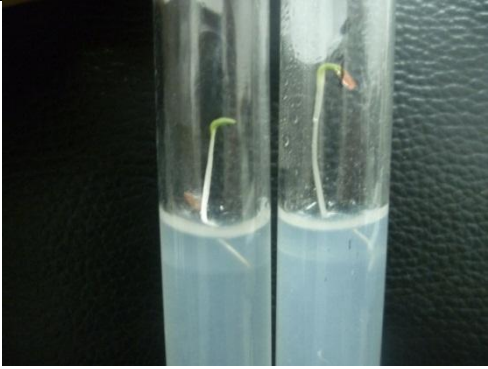
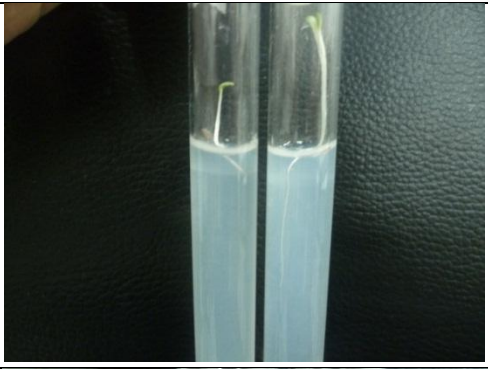

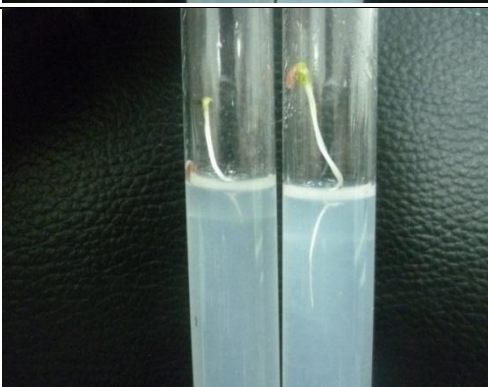
2. Crecimiento de semillas germinadas de Lechuga mediado por la influencia de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno.

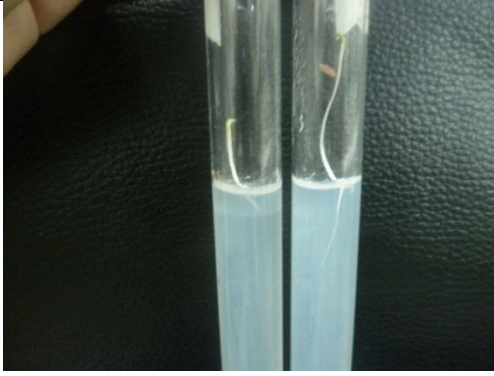
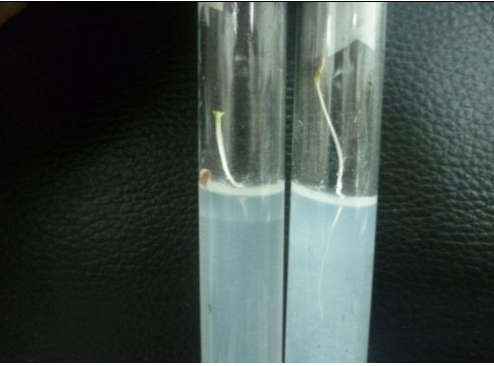
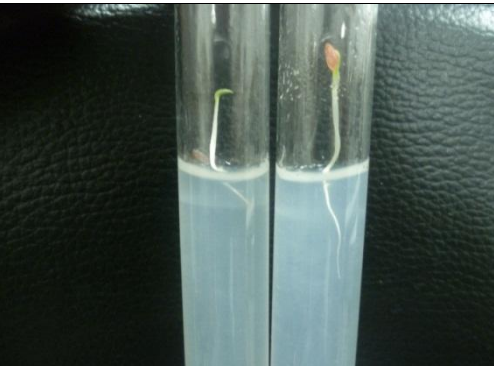
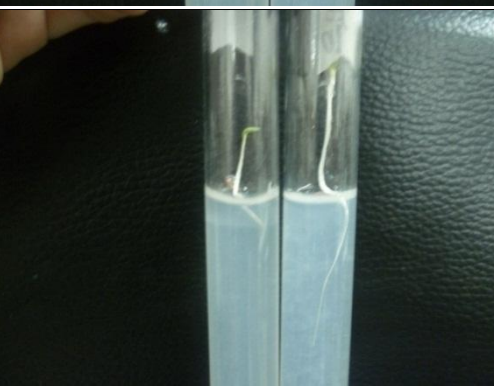
CEPA	GÉNERO	CRECIMIENTO DE LECHUGAS (Tubo a la Izquierda es el Blanco, tubo a la derecha tubo con inoculo respectivo)
Blanco		

JBUTP_GEA_BS_A002	Nocardia	
JBUTP_GEA_BS_A005	Nocardia	
JBUTP_GEA_BS_A006	Nocardia	
JBUTP_GEA_BS_A007	Nocardia	




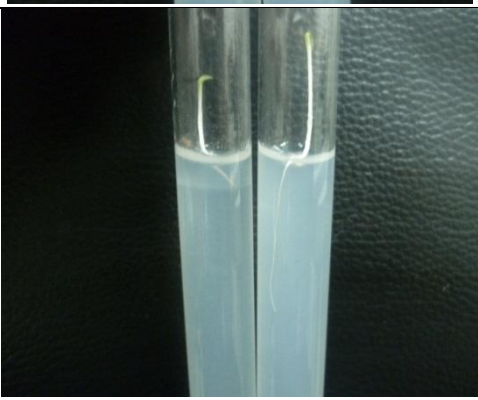
JBUTP_GEA_BS_A008	Streptomyces	
JBUTP_GEA_BS_A009	Streptomyces	
JBUTP_GEA_G_A012	Nocardia	
JBUTP_GEA_G_A013	Nocardia	

JBUTP_GEA_G_A014	Nocardia	
JBUTP_GEA_H_A016	Nocardia	
JBUTP_GEA_H_A017	Streptomyces	
JBUTP_GEA_H_A018	Streptomyces	

JBUTP_GEA_H_A019	Streptomyces	
JBUTP_GEA_H_A020	Streptomyces	
JBUTP_GEA_H_A022	Nocardia	
JBUTP_GEA_BS_A024	Streptomyces	

JBUTP_GEA_BS_A025	Nocardia	
JBUTP_GEA_G_A026	Streptomyces	
JBUTP_GEA_G_A027	Streptomyces	
JBUTP_GEA_G_A028	Streptomyces	



JBUTP_GEA_G_A029	Streptomyces	
JBUTP_GEA_G_A030	Nocardia	
JBUTP_GEA_G_A031	Streptomyces	
JBUTP_GEA_G_A032	Streptomyces	

**ANEXO 5. Análisis Estadístico Descriptivo y ANOVA del efecto de los actinomicetos fijadores de nitrógeno en las plántulas de lechuga**

**A. Análisis Descriptivo del efecto de los actinomicetos fijadores de nitrógeno en las plántulas de lechuga**

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Blanco	3	3,200	0,2000	0,1155	2,703	3,697	3,0	3,4
JBUTP_GEA_BS_A002	3	6,033	0,1528	0,0882	5,654	6,413	5,9	6,2
JBUTP_GEA_BS_A005	3	6,500	0,2000	0,1155	6,003	6,997	6,3	6,7
JBUTP_GEA_BS_A006	3	5,300	0,2000	0,1155	4,803	5,797	5,1	5,5
JBUTP_GEA_BS_A007	3	6,267	0,2517	0,1453	5,642	6,892	6,0	6,5
JBUTP_GEA_BS_A008	3	6,967	0,1528	0,0882	6,587	7,346	6,8	7,1
JBUTP_GEA_BS_A009	3	5,933	0,1155	0,0667	5,646	6,220	5,8	6,0
JBUTP_GEA_G_A012	3	5,033	0,2517	0,1453	4,408	5,658	4,8	5,3
JBUTP_GEA_G_A013	3	5,333	0,2082	0,1202	4,816	5,850	5,1	5,5
JBUTP_GEA_G_A014	3	6,467	0,1528	0,0882	6,087	6,846	6,3	6,6
JBUTP_GEA_H_A016	3	6,667	0,2309	0,1333	6,093	7,240	6,4	6,8
JBUTP_GEA_H_A017	3	5,767	0,6807	0,3930	4,076	7,458	5,0	6,3
JBUTP_GEA_H_A018	3	5,200	0,2000	0,1155	4,703	5,697	5,0	5,4
JBUTP_GEA_H_A019	3	4,133	0,1528	0,0882	3,754	4,513	4,0	4,3
JBUTP_GEA_H_A020	3	6,667	0,1528	0,0882	6,287	7,046	6,5	6,8
JBUTP_GEA_H_A022	3	5,200	0,2000	0,1155	4,703	5,697	5,0	5,4
JBUTP_GEA_BS_A024	3	4,067	0,0577	0,0333	3,923	4,210	4,0	4,1
JBUTP_GEA_BS_A025	3	6,100	0,1732	0,1000	5,670	6,530	6,0	6,3
JBUTP_GEA_G_A026	3	5,300	0,2646	0,1528	4,643	5,957	5,0	5,5
JBUTP_GEA_G_A027	3	4,400	0,1732	0,1000	3,970	4,830	4,2	4,5
JBUTP_GEA_G_A028	3	6,967	0,1528	0,0882	6,587	7,346	6,8	7,1
JBUTP_GEA_G_A029	3	6,667	0,1528	0,0882	6,287	7,046	6,5	6,8
JBUTP_GEA_G_A030	3	5,400	0,2646	0,1528	4,743	6,057	5,1	5,6
JBUTP_GEA_G_A031	3	4,467	0,1528	0,0882	4,087	4,846	4,3	4,6
JBUTP_GEA_G_A032	3	6,167	0,1528	0,0882	5,787	6,546	6,0	6,3
Total	75	5,608	1,0036	0,1159	5,377	5,839	3,0	7,1

**B. Análisis ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	71,909	24	2,996	57,034	0,000
Intra-grupos	2,627	50	0,053		
Total	74,535	74			

### C. Análisis POSTANOVA

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blanco	3	3,200								
JBUTP_GEA_BS_A024	3		4,067							
JBUTP_GEA_H_A019	3		4,133							
JBUTP_GEA_G_A027	3		4,400							
JBUTP_GEA_G_A031	3		4,467							
JBUTP_GEA_G_A012	3			5,033						
JBUTP_GEA_H_A018	3			5,200						
JBUTP_GEA_H_A022	3			5,200						
JBUTP_GEA_BS_A006	3			5,300						
JBUTP_GEA_G_A026	3			5,300						
JBUTP_GEA_G_A013	3			5,333						
JBUTP_GEA_G_A030	3			5,400	5,400					
JBUTP_GEA_H_A017	3				5,767	5,767				
JBUTP_GEA_BS_A009	3					5,933	5,933			
JBUTP_GEA_BS_A002	3					6,033	6,033			
JBUTP_GEA_BS_A025	3					6,100	6,100	6,100		
JBUTP_GEA_G_A032	3					6,167	6,167	6,167		
JBUTP_GEA_BS_A007	3						6,267	6,267	6,267	
JBUTP_GEA_G_A014	3							6,467	6,467	
JBUTP_GEA_BS_A005	3							6,500	6,500	
JBUTP_GEA_H_A016	3								6,667	6,667
JBUTP_GEA_H_A020	3								6,667	6,667
JBUTP_GEA_G_A029	3								6,667	6,667
JBUTP_GEA_BS_A008	3									6,967
JBUTP_GEA_G_A028	3									6,967
Sig.		1,000	0,055	0,096	0,056	0,060	0,118	0,060	0,065	0,160