

ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN ECOSISTEMAS DEL VALLE DEL CAUCA

Paola Andrea Asprilla Carabalí

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: paola.asprilla@correounivalle.edu.co

Irma Janeth Sanabria

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: Janeth.sanabria@correounivalle.edu.co

Oscar Mauricio Rodríguez

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: oscar.mauricio.rodriguez@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Grupos taxonómicos de los dominios *Archaea* y *Bacteria* emplean el nitrógeno atmosférico y lo transforman en compuestos de gran importancia a nivel celular como las proteínas y los ácidos nucleicos. Existen varias rutas bioquímicas establecidas dentro de un proceso general denominado “Ciclo del Nitrógeno”. Las bacterias fijadoras de nitrógeno transforman el Nitrógeno molecular a Nitrógeno combinado. Estas bacterias son diversas metabólicamente y ecológicamente en relación a los ecosistemas en donde se encuentran. Este estudio tiene como objetivo analizar la composición y distribución de bacterias fijadoras de nitrógeno en ecosistemas naturales y construidos¹. Mediante el aislamiento de microorganismos diazotófos a partir de muestras de suelo y lodos de aguas residuales domésticas e industriales en medios líquidos libres de nitrógeno. Se usaron diferentes fuentes de carbono y se recuperaron en agar RBA. Se estableció por medio de la prueba t-student pareada ($t_{(15)} = -2.40$ $p=0.03$) que el medio RBA permitió la mayor recuperación de bacterias fijadoras en los diferentes ecosistemas. De acuerdo con el criterio de información de Akaike no se encontraron diferencias entre los medios con diferentes fuentes de carbono. Se logró aislar siete géneros asociados a la fijación de nitrógeno: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Escherichia*. Géneros que han sido ampliamente estudiados por su alta capacidad de fijación. El uso de medios libres de nitrógeno permitió el aislamiento y cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno y representa un avance relevante en el conocimiento de este tipo de microorganismos en ecosistemas de la región.

Palabras clave: Fijación biológica de nitrógeno, diazotófos, aislamiento, medio libre de N, RBA.

¹ Se denominan sistemas construidos a los sistemas de tratamiento biológico de residuos, industriales y domésticas

ABSTRACT

Taxonomic groups of Archaea and Bacteria domains take atmospheric nitrogen and transform it into compounds of great importance at cellular level, such as proteins and nucleic acids, through biochemical pathways established within a process called "Nitrogen Cycle". Nitrogen-fixing bacteria are metabolically and ecologically diverse in the ecosystems where they are found. This study aims to analyze the composition and distribution of nitrogen-fixing bacteria in both natural and artificial ecosystems². Consequently, diazotrophic microorganisms were isolated from soil samples and wastewaters (domestic and industrial) in nitrogen-free liquid media, with different carbon sources, and in RBA agar. It was established by a paired *t*-test ($t_{(15)} = -2.40$, $p = 0.03$) that RBA medium allowed the greatest recovery of fixing bacteria in different ecosystems. According to Akaike information criterion (AICc) no differences were found between the media with different carbon sources and between different localities. It was possible to isolate seven genera of nitrogen-fixing bacteria: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus* and *Escherichia*. Genera that have been extensively studied for their high fixing ability. The use of nitrogen-free media allowed the isolation and quantification of nitrogen-fixing bacteria, which represents a relevant advance in the knowledge of these microorganisms in ecosystems of the region.

Key words: *biological nitrogen fixation, diazotrophs, isolation, N free media, RBA.*

² They are denominated artificial systems to the systems of biological treatment of industrial and domestic residues

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es un elemento fundamental en la estructura de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas esenciales de todo ser vivo. Este gas incoloro, inodoro e inerte, constituye el 79% de la atmósfera terrestre. En los ecosistemas, este gas es convertido a formas reactivas involucrando una serie de reacciones bioquímicas que dan lugar al denominado “Ciclo del Nitrógeno”. Un conjunto de reacciones de asimilación y desasimilación, catalizadas por enzimas, facilitan la transformación del N_2 a diferentes compuestos nitrogenados con diversos estados de oxidación (Zhao *et al.* 2015). La fijación biológica de nitrógeno (FBN), es el primer paso de este ciclo y consiste en el rompimiento del triple enlace de la molécula de N_2 mediante reducción enzimática dando como resultado el amonio.

La FBN es desarrollado estrictamente por procariotas, mayoritariamente del dominio *Bacteria*, aunque algunos microorganismos del dominio *Archaea*, específicamente del filo *Euryarchaeota* han sido reportados como fijadores de nitrógeno (Dos Santos *et al.* 2012). Los diazótrofos, como se denomina a los microorganismos fijadores de nitrógeno, se han agrupado de acuerdo con sus relaciones ecológicas en: diazótrofos de vida libre, asociativos no simbióticos y asociativos simbióticos (Rodríguez 2014). Cuentan con un complejo enzimático llamado nitrogenasa, el cual es el encargado de romper el triple enlace del N_2 y está conformado por dos proteínas: dinitrogenasa y dinitrogenasa-reductasa. Ambas proteínas contienen hierro, sin embargo, en la dinitrogenasa, el hierro junto al molibdeno forman parte del factor *FeMo-co* (*MoFe₇S₈-homocitrato*), sitio

activo para la reducción del N_2 (Krapp 2015, Hoffman *et al.* 2014, Moure *et al.* 2013). Se ha reportado que la fijación biológica de nitrógeno anualmente aporta 3.0 Tg de nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres, ayudando así en la fertilización de suelos, producción eficiente de alimentos y la disminución significativa de fertilizantes nitrogenados industriales (Núñez 2012, Lagurara 2014). Los fertilizantes industriales actualmente son elaborados en el proceso Haber-Bosch, empleando catalizadores como el osmio para unir moléculas de N_2 e H_2 a altas temperaturas y presiones, con consumos anuales del 1% de la energía del planeta (Nuñez 2012). En consecuencia se listan daños a los ecosistemas, contaminación de aguas superficiales y subterráneas, desequilibrios de los nutrientes en el suelo y el aumento del efecto invernadero, asociados al proceso Haber-Bosch (Sullivan *et al.* 2014). Los altos contenidos de nitrógeno que llegan a las fuentes hídricas ocasionan eutrofización de los cuerpos de agua y pérdidas en las interacciones ecológicas de los microorganismos (Pires *et al.* 2015, Ledesma 2013).

Debido a tales efectos en los ecosistemas, la transformación por procesos biológicos ofrecen ventajas y representan una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química (Howard & Rees 1996).

Uno de los retos en términos de fijación de nitrógeno, es el conocimiento de la diversidad, metabolismo e interacciones de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) existentes en los diversos ecosistemas, suelos empleados en agricultura, cuerpos de agua dulce y salobre, y sistemas de tratamiento de aguas residuales. Ecosistemas donde se han reportado varios

géneros y especies de microorganismos diazótrofos (Ansola *et al.* 2014, Bentzon-Tilia *et al.* 2015, Ledesma *et al.* 2013).

Conocer esta diversidad permitirá la implementación de nuevas tecnologías capaces de mantener el equilibrio en el ciclo del nitrógeno, disminuyendo significativamente la cantidad de nitrógeno ingresado a los sistemas por los diferentes procesos antrópicos y con ello, los contaminantes vertidos al medio ambiente. Este trabajo tiene como objetivo analizar la composición y distribución de BFN en diferentes ecosistemas naturales y construidos. Realizando una caracterización de BFN cultivables a partir de inóculos provenientes de diferentes ecosistemas. Y determinar diferencias en términos de abundancia de bacterias fijadoras entre los ecosistemas.

METODOLOGÍA

En total fueron tomadas cuatro muestras durante el mes de Junio del 2016 en diferentes zonas del Departamento del Valle del Cauca. Dos muestras fueron tomadas de suelos, uno con vocación agrícola en la zona de Candelaria (C), mientras que el otro fue tomado en la parte alta del pueblo de Pance (P) sin ninguna intervención agrícola. Ambas muestras fueron tomadas a una profundidad de aproximadamente 30 centímetros.

La muestra de lodo del sistema de tratamiento de aguas residuales industriales (ARI) fue obtenida de una planta productora de extractos de levadura y bio-ingredientes para la nutrición humana, animal y vegetal, ubicada en la ciudad de Tuluá. La muestra de lodo de un sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas (ARD), fue tomada en una planta de tratamiento ubicada en el sur de

la ciudad de Cali.

Todas las muestras fueron recolectadas en recipientes estériles de 500 mL, no se refrigeraron y se transportaron al laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental del programa de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la Universidad del Valle, en el cual fueron procesadas el mismo día de la toma de muestra con el fin de evitar alteraciones en la composición microbiana.

Análisis de cultivabilidad

Debido a que el agua peptonada aportaría fuente de nitrógeno a las bacterias, las diluciones seriadas se realizaron en solución salina (0.85% NaCl) a partir de un gramo de muestra de suelo y lodo. Las diluciones desde 10^{-3} hasta 10^{-9} de cada muestra se sembraron por duplicado en agar nutritivo, tomando 100 μ L de cada dilución, homogeneizando con perlas e incubando a 37°C durante 24 horas. Adicionalmente, se inoculó cada una de las diluciones en un medio de cultivo líquido libre de nitrógeno, con cuatro fuentes de carbono diferente: glucosa, maltosa, manitol, piruvato de sodio. Cada fuente de carbono fue evaluada de manera individual. Los componentes del medio fueron 2 g/L de la fuente de carbono más solución standart (g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.100; NaCl, 0.100; K_2HPO_4 , 0.100; KH_2PO_4 , 0.100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.100; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.010; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.005 y 3 mL de solución de oligoelementos (g/L): H_3BO_3 , 0.30; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.20; $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.10.

Las diluciones se incubaron a 37°C durante 7 a 14 días dependiendo del grado de crecimiento observado. Durante la fase

experimental se hicieron tres repiques en el mismo medio líquido. En el último repique, se confirmó el crecimiento bacteriano midiendo la absorbancia a 620 nm de longitud de onda, en un mL de medio.. Se tomaron 100 µL y se inoculó en el mismo tipo de medio (Fuente de carbono + solución estándar) con 15 g/L de agar-agar, incubando durante 24 horas. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento en agar RBA (DSMZ medio 441) manteniendo las mismas condiciones de incubación. La composición del medio RBA es: **Solución A:** KH_2PO_4 0.100 g, K_2HPO_4 0.900 g, NaCl 0.100 g, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0.100 g, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.100 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{NaVO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0.010 g, Extracto de levadura 0.050 g, Elementos traza, solución. SL-6: 3.000 ml, Agua destilada 950.000 ml, Agar 15.000 g. Ajustar pH a 7.3. **Solución B:** Succinato de sodio 1.000 g, DL-Malato 2.000 g, Piruvato de sodio 1.000 g, D-Manitol 2.000 g, D-Glucosa 2.000 g, Agua destilada 50.000 ml- Ajustar pH a 7.3 (Bentzon-Tilia *et al.* 2015).

Se usó como herramienta para la clasificación e identificación bacteriana el Manual de Bergey's (2006). Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de los géneros asociados con la fijación de nitrógeno, complementando las identificaciones con siembras en medios selectivos, Eosina-Azul de Metileno (EMB), Macconkey, Manitol-Levadura (MYA), Polimixina-Yema de huevo-Manitol (MYP), Cetrimide, Actinomicetos, Ashby, NFb y JNFb (Baldani *et al.* 2014, Dadook *et al.* 2014, Imhoff 2005, Schleifer 2006, Tallent *et al.* 2012, Vos *et al.* 2011, Kuever & Widdel 2006, Garrity *et al.* 2006).

Enzimas codificadas genéticamente como catalasas, ureasas, peroxidasas, entre otras, son verificadas y determinadas por pruebas bioquímicas. Estas enzimas, desarrollan funciones en el metabolismo bacteriano, que se evidencian en medios de cultivo con sustratos especiales, los cuales contienen indicadores que revelan una actividad metabólica específica.

Los fundamentos de las pruebas bioquímicas que se realizaron son:

- El metabolismo del citrato se lleva a cabo en bacterias poseedoras de Citrato permeasa, los productos de la transformación del citrato son oxalacetato y piruvato. Este último en medios alcalinos genera ácidos orgánicos que hacen que el medio vire de verde a azul.

- En la prueba ureasa, la enzima ureasa hidroliza la urea liberando amoníaco y CO_2 , productos que alcalinizan el medio y generan un viraje de amarillo a rojo.

- La enzima B-galactosidasa hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa. Los microorganismos que poseen esta enzima son capaces de fermentar lactosa, actividad que se observa a partir de la producción de gas en tubos Durham.

- Nitrato, con esta prueba se detectan microorganismos que poseen la enzima Nitrato reductasa, la cual reduce nitratos en nitritos. Los nitritos se detectan en los cultivos con la adición del reactivo de Griess originando una coloración roja.

- Gelatina, la presencia de enzimas proteolíticas que hidrolizan la gelatina, se confirma con la apariencia acuosa del medio.

- La enzima Catalasa está presente en la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas. La enzima interacciona con peróxido de hidrógeno dando como resultado O_2 y H_2O , liberando burbujas en el medio, lo cual indica que la prueba es

positiva.

- La acción de la enzima Citocromo-C-Oxidasa se verifica con la prueba Oxidasa, identificando cepas bacterianas aerobias o anaerobias facultativas capaces de oxidar el compuesto N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-fenilendiamina, observándose una coloración azul en el medio.
- La prueba de motilidad ayuda a detectar la presencia de flagelos en las bacterias y su capacidad de desplazamiento.
- La prueba de Indol confirma la presencia de Triptofanasa, enzima que hidroliza el triptófano generando indol, ácido pirúvico y amoniaco. El indol se observa con la adición de reactivo de Kovacs, si el medio se torna rojo, la

prueba es positiva (Madigan *et al.* 2008, Rojas 2011).

Análisis estadísticos

Con el fin de comparar la capacidad de recuperar bacterias fijadoras de nitrógeno entre los medios de cultivos y la cantidad de bacterias fijadoras en las diferentes localidades, se emplearon modelos lineales generalizados con distribución normal. Adicionalmente, con el fin de comparar la capacidad de recuperar bacterias fijadoras de nitrógeno entre agar RBA y los medios de cultivo libres de nitrógeno, se realizó una prueba de t pareada. Los análisis se realizaron con el programa estadístico R 3.3.2 (R Development Core Team, 2012).

RESULTADOS

Análisis de cultivabilidad

La densidad de bacterias generales en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo (UFC/g), fue estimada por conteos directos de colonias en placa, a partir de muestras de suelo de las Tabla 1. Número de colonias en UFC/g de las muestras de suelos y lodos de las diferentes localidades en agar nutritivo.

localidades Pueblo Pance (P) y Candelaria (C), y lodos de Aguas residuales domésticas (ARD) y Aguas residuales industriales (ARI) en agar nutritivo (tabla 1).

Localidad	UFC/g
P	1,09x10 ⁶
C	3,00 x10 ⁷
ARD	3,00 x10 ⁷
ARI	1,07 x10 ⁷

La tabla 1 indica que la mayor densidad de bacterias generales en UFC/g se encontró en las localidades C y ARD, mientras que la menor densidad se observó en la muestra de la localidad P. Los conteos directos en placa son un estimativo de la diversidad de las muestras en términos de

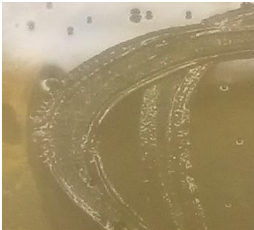
abundancia relativa de colonias, pero requiere de pruebas adicionales de identificación que permitan establecer el estado de diversidad de las especies.

Para el caso del medio de cultivo RBA, un total de diecinueve colonias con características morfológicas diferentes se

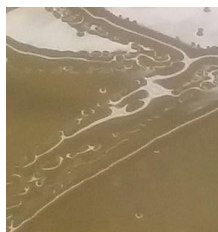
seleccionaron. El criterio de selección de los morfotipos se basó en la coloración, forma, borde, elevación y tamaño de las colonias, de acuerdo con la Guía de Laboratorio de Microbiología General, Departamento de Biología, Universidad del Valle (Torres 2014). La tabla 2 muestra la descripción macroscópica de las

bacterias fijadoras aisladas de las localidades P, C, ARD y ARI. De los diecinueve morfos aislados, doce se observaron en la localidad P, ocho en la C, siete en ARD y nueve en ARI, de los cuales, sólo cuatro se encontraron en la localidad P, uno en la C, uno en ARD y tres en ARI.

Tabla 2. Características macroscópicas para la identificación de las colonias aisladas

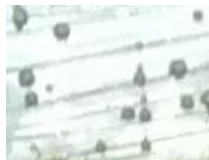
MORFO	CARACTERÍSTICAS	FOTOGRAFÍA	LOCALIDAD
1.	Colonias pequeñas, redondas, transparentes, acuosas de borde entero, planas.		P, C, ARD y ARI
3.	Colonias pequeñas, puntiformes, blancas de borde irregular y planas.		C, ARD y ARI
4.	Colonias grandes, en forma de gota de agua, transparentes de borde irregular.		P, C, ARD y ARI
5.	Colonias puntiforme, de color crema a blanco de borde irregular y planas.		C y ARI

6. Colonias pequeñas, circulares de bordes enteros, convexos y acuosos.



C

8. Colonias transparentes, puntiformes de borde ondulado y planas.



P, C, ARD y ARI

9. Colonias pequeñas, puntiformes de borde ondulado, blancas y planas.



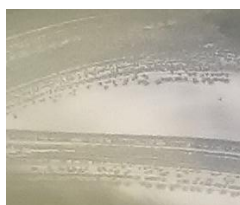
P, C, ARD y ARI

10. Colonias honguiformes, filamentosas de borde filamentosos.



P y C

11. Colonias pequeñas, puntiformes de borde entero, color crema y planas.



P y ARI

12. Colonia honguiforme, cremosa, plana de borde filamentosos.



P

Colonias redondas,

13. grandes

ARD



14.

Colonias redondas de borde entero, convexas y blancas-cremosas.

ARD y ARI



15.

Colonias pequeñas, puntiformes, transparentes, similares al morfo 1.

P



16.

Colonias de borde ondulado, irregulares, planas y blancas.

ARI



17.

Colonias de borde irregular, transparentes-cremosas, convexas.

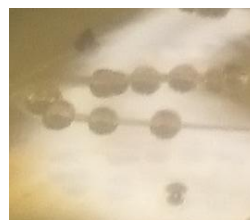
ARI

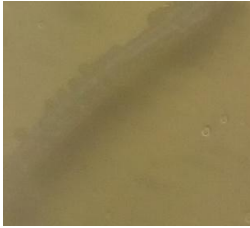
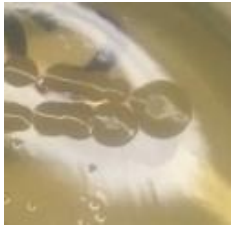


20.

Colonias circulares, transparentes de borde entero.

P



21.	Colonias pequeñas, puntiformes, blancas y planas.		P
23.	Colonias uniformes, transparentes, convexas de borde ondulado, irregulares.		ARI

A los morfotipos caracterizados macroscópicamente, se les realizó pruebas bioquímicas y se logró identificar los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Citrobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Escherichia*. La tabla 3 muestra los resultados de las reacciones de identificación de los géneros y como complemento a las pruebas bioquímicas se realizaron tinciones de Gram relacionadas en la tabla 4.

Los análisis morfológicos y fisiológicos comunes para la identificación de géneros de la familia Enterobacteriaceae (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Escherichia*) son: oxidasa negativa, catalasa positiva, reducción de nitratos a nitritos y morfológicamente son bacilos gramnegativos. Para distinguir entre los géneros de esta familia, se observaron las particularidades de cada uno de acuerdo con el diagnóstico realizado. El género *Escherichia* a diferencia de los otros géneros es indol positiva, movilidad

positiva o negativa, y citrato negativa. Por otro lado, la presencia de la enzima ureasa se evidenció en *Klebsiella*, característica diferencial que permitió su identificación. Las pruebas bioquímicas realizadas no permitieron establecer diferencias entre los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter*, sin embargo, posteriores siembras en medios selectivos confirmaron el aislamiento de ambos géneros.

Continuando con la caracterización de los géneros, se encontró que tanto *Rhizobium* como *Azotobacter* son bacilos gram negativos, con respuestas similares a las pruebas desarrolladas. La única diferencia establecida entre ambos géneros es la presencia de citrato permeasa en los aislados de *Azotobacter*.

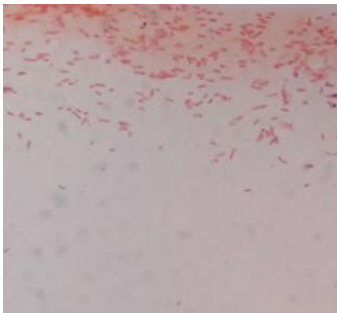
Por otro lado, morfológicamente el género *Bacillus* fue el único bacilo gram positivo, no posee la enzima ureasa, presenta enzimas proteolíticas que hidrolizan la gelatina y al igual que los demás géneros aislados es catalasa positiva.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas para la identificación de las colonias aisladas.

Género	Citrato	Urea	B-galactosidasa	Nitrato	Gelatina	Catalasa	Oxidasa	Movilidad	Indol	Gram
<i>Rizhobium</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Citrobacter</i>	+	-	d	+	-	+	-	+	+	-
<i>Azotobacter</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i>	+	-	+	+	Lento	+	-	+	-	-
<i>Escherichia</i>	-	-	+	+	-	+	-	+o-	+	-
<i>Bacillus</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+

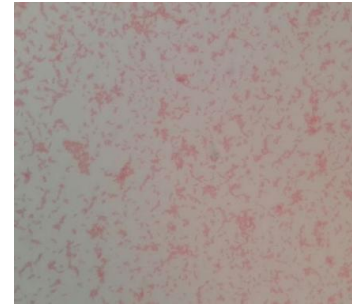
d* Variación entre el 26-75% de las reacciones.

Tabla 4. Características microscópicas para la identificación de las colonias aisladas

GÉNERO	CARACTERÍSTICAS	FOTOGRAFÍA
<i>Azotobacter</i>	Bacilos Gram negativos	
<i>Citrobacter</i>	Bacilos Gram negativos	
<i>Klebsiella</i>	Bacilos Gram negativos	

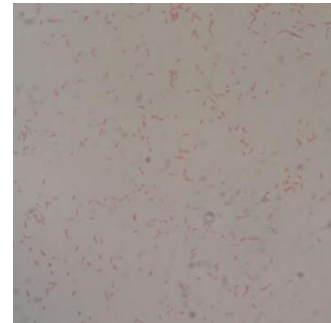
***Enterobacter-
Citrobacter***

Bacilos cortos, Gram
negativos



Escherichia

Bacilos cortos, Gram
negativos



Bacillus

Bacilos delgados, alargados
forman cadenas, Gram
positivos



La confirmación de todos los géneros encontrados, se realizó en medios selectivos y diferenciales. Las especies de enterobacterias crecieron fácilmente en agar Eosina Azul de Metileno, debido a su rápido desarrollo y escasos requerimientos nutricionales.

El medio YMA es el medio más usado para el aislamiento y caracterización de *Rhizobium*, lo cual permitió diferenciarlo de otros microorganismos.

El agar MYP es un medio selectivo y diferencial que mostró la capacidad de *Bacillus* de utilizar manitol. Y la adición de Polymyxin B inhibió el crecimiento de bacterias Gram negativas. *Azotobacter* creció en Ashby, debido a su

capacidad de usar manitol y nitrógeno atmosférico.

No se observó crecimiento en agar Cetrimide, indicando que dentro de los aislados no se obtuvo colonias del género *Pseudomonas*.

El agar Actinomicetos se usó para verificar la presencia de actinomicetos en los aislados, pero los resultados no fueron concluyentes, motivo por el cual no se reportó en este trabajo. Finalmente, no se pudo comprobar la presencia de *Herbaspirillum* ni *Azospirillum*, a través de los medios de cultivo JNFb y NFb.

En la figura 1 se observa la morfología de los géneros aislados y verificados en los medios selectivos.



Figura 1. Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en diferentes medios selectivos. A. *Enterobacter* en EMB, B. *Escherichia coli* en EMB, C. *Klebsiella* en EMB, D. *Rhizobium* en YMA, E. *Bacillus* en MYP, F. *Citrobacter* en EMB, G. *Azotobacter* en Ashby.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos a partir de los recuentos en medios con diferentes fuentes de carbono y agar RBA, indicaron que no se presentan diferencias en la cantidad de bacterias fijadoras entre las diferentes fuentes de carbono ni entre las diferentes localidades. El modelo constante fue el que recibió mayor soporte por parte de los datos (menor valor de AICc) para los medios con diferentes fuentes de carbono y para RBA, de acuerdo con este se encontró un valor promedio [intervalo de confianza del 95%] de bacterias fijadoras

de 11.581.414 [3.986.323, 33.647.340] para agar RBA y de 2.774.825 [1.113.593, 6.914.249] para las diferentes fuentes de carbono. Adicionalmente, se compararon los valores de UFC/g del medio RBA y de los medios con diferentes fuentes de carbono a través de una prueba t-student pareada, encontrando diferencias significativas ($t_{(15)} = -2.40$ $p=0.03$) de valores promedios para medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (promedio: de 8.261.123, desviación estándar=9.539.137) y para agar RBA (51.523.217, 71.120.749). Esta prueba

permitió establecer que los valores de recuperación de bacterias fijadoras en agar RBA fueron mayores comparados con los

medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono.

Tabla 5a. Comparación de modelos para la recuperación de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono. AICc: Criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas.

Diferentes fuentes de Carbono				
Modelo	Parámetros	AICc	Delta	Peso
Constante	2	74,20	0,00	0,98
Localidad	5	83,40	9,22	0,01
Medio	5	83,60	9,46	0,01
Localidad + Medio	8	102,20	27,96	0,00

Tabla 5b. Comparación de modelos para la recuperación de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de agar RBA. AICc: Criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas. Selección del modelo lineal generalizado a partir de agar RBA

Agar RBA				
Modelo	Parámetros	AICc	Delta	Peso
Constante	2	69,20	0,00	0,93
Localidad	5	74,60	5,37	0,06
Medio	5	78,90	9,66	0,01
Localidad + Medio	8	93,10	23,87	0,00

DISCUSIÓN

La densidad de bacterias generales en UFC/g de suelo y lodo fue mayor en los ecosistemas C y ARD, mientras que la localidad P, presentó la menor densidad. Este resultado probablemente puede ser explicado por la presencia de altas cargas de materia orgánica en el caso de la localidad ARD y con posibles procesos de

selección de microorganismos en la localidad C, debido a la actividad agrícola que se desarrolla, influyendo en mayores concentraciones bacterianas por unidad de área (gramo de suelo y lodo). Esto no implica que suelos poco intervenidos antrópicamente como la localidad P posean menos microorganismos, por el contrario existe una mayor riqueza de especies pese a que las abundancias

relativas registradas en este trabajo sean menores, lo que se confirmó con la cantidad de morfotipos aislados de la localidad P en comparación con las demás localidades (Tabla 2). Se debe tener en cuenta que la distribución ecológica de las bacterias en ecosistemas específicos está modulada por diversos factores como características químicas y físicas de los sustratos, humedad, materia orgánica, pH e interacciones microbianas (Mantilla *et al.* 2007).

En el aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno los medios de cultivo fueron determinantes en el proceso. Debido a que la fuente de nitrógeno y carbono son esenciales y constituyen un aspecto clave en el crecimiento de los microorganismos (Mirza & Rodrigues 2012). En diazótrofos, la disponibilidad de fuentes de nitrógeno en los medios de cultivo reduce o inhibe la actividad del complejo nitrogenasa, por tal razón es recomendable que durante el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, la fuente de nitrógeno sea insignificante o inexistente. Gutiérrez-Rojas *et al.* (2011) evaluaron medios de cultivo combinando fuentes de carbono: sacarosa, glucosa, manitol y benzoato de sodio, con fuentes de nitrógeno: extracto de levadura, extracto de carne, cloruro de amonio y sulfato de amonio. Mostrando que bajas concentraciones de extracto de levadura combinado con sacarosa como fuente de carbono, permitió la mayor actividad de la nitrogenasa y el aumento de biomasa en *Azotobacter chroococcum*. Al igual que estos autores, se logró aislar cepas del género *Azotobacter* y además se encontró que las diferentes fuentes de carbono del medio RBA (Succinato de sodio, DL-malato, piruvato de sodio, manitol y glucosa) permitieron la mayor

recuperación de bacterias fijadoras. En la investigación realizada por Behrendt *et al.* (2010), emplearon agar RBA en el aislamiento de *Paenibacillus* en suelos de Alemania, reportando cantidades significativas de los aislados. Por otro lado, el uso de glucosa, maltosa, manitol y piruvato como fuentes de carbono para aislar fijadoras no mostraron diferencias en términos de UFC/g. Pese a que no se observaron diferencias entre los medios con diferentes fuentes de carbono, en promedio, el medio que contenía glucosa presentó el mayor valor en UFC/g, seguido por manitol, piruvato y maltosa. Las fuentes de carbono en medios de cultivo reviste gran importancia debido a la necesidad de las células de grandes cantidades de carbono para elaborar nuevo material celular. Y el uso de fuentes de carbono específicas permite el crecimiento de determinados microorganismos. Influyendo en la identificación de los mismos. En estudios previos se ha observado que el uso de medios de cultivo con manitol como fuente de carbono, permite el crecimiento de cepas del género *Azotobacter* debido a sus altas tasas metabólicas y altos requerimientos energéticos (Inomura *et al.* 2017). En microorganismos fijadores de nitrógeno los costos energéticos son elevados debido a que el rompimiento de una molécula de N_2 requiere el uso aproximado de 16 moléculas de ATP. El consumo de ATP puede ser la explicación por la cual la mayor recuperación de fijadoras se dio en el medio de cultivo que contenía glucosa. Ya que la glucosa es el principal componente orgánico que permite llevar a cabo la respiración celular generando entre 36-38 moléculas de ATP (Madigan *et al.* 2011). En la primera etapa de la respiración celular por cada glucosa se

generan dos moléculas de piruvato, dos de NADH y dos de ATP. Por el contrario, cuando se usó el medio de cultivo que contenía piruvato como fuente de carbono se obtuvo menores recuentos, debido a que el crecimiento celular en este medio fue menor por el hecho de que por gramo de piruvato empleado existía la mitad de moléculas de piruvato, NADH y ATP comparado con el medio de cultivo que contenía glucosa. Sin embargo nuestros resultados mostraron que el medio con menor promedio de UFC/g fue maltosa y si nos basamos en este mismo criterio de comparación, tenemos que por cada maltosa en condiciones normales, se formarían 4 moléculas de piruvato que ingresaría a la respiración celular. Valor que duplica la cantidad de moléculas de ATP, una de las posibles explicaciones es la especificidad metabólica que presentan los microorganismos, las cuales son determinadas por un amplio espectro de genes que regulan la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, incluyendo un amplio grupo de genes transportadores (Yan *et al.* 2008). Estos autores reportaron sistemas de transporte de carbohidratos en *Pseudomona stutzeri*, especie asociada con la fijación de nitrógeno. La disponibilidad o no de transportadores de carbohidratos a nivel celular limita significativamente el uso de fuentes de carbono específicas, como maltosa (Álvarez *et al.* 2015). Dando como resultado mayor o menor uso de determinadas fuentes de carbono por microorganismos diazótrofos.

A partir de los aislados de bacterias fijadoras de nitrógeno provenientes de suelos y lodos de aguas residuales domésticas e industriales del Valle del Cauca, se identificaron siete géneros asociados con FBN. De acuerdo con las pruebas bioquímicas y las siembras en

medios selectivos, los géneros corresponden a *Azotobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rhizobium* y *Escherichia* con la especie *E. coli*. El aislamiento de estos microorganismos en medio libre de nitrógeno permitió asociarlos con microorganismos capaces de fijar nitrógeno. Los géneros aislados en esta investigación pertenecen a la clase Gammaproteobacteria, familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae; clase Alphaproteobacteria, familia Rhizobiaceae; y clase Bacilli, familia Bacillaceae (Garrity *et al.* 2006, Vos *et al.* 2011, Imhoff 2005). Se ha reportado que estos géneros presentan actividades metabólicas que promueven el crecimiento vegetal (PGP), y han sido aislados de cultivos de gran interés para la alimentación humana (Beneduzi *et al.* 2013, Hungria *et al.* 2013). La producción de metabolitos en estos géneros, les permiten establecer interacciones y llevar a cabo procesos, como solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fitohormonas y fijación de nitrógeno (de Souza *et al.* 2015).

Los géneros *Bacillus* y *Escherichia* se aislaron en todos los ecosistemas muestreados, lo cual indica la diversidad de adaptaciones que tienen ambos géneros a diferentes condiciones ambientales. Presentes tanto en suelos con actividades agrícolas, como en sistemas de tratamiento de aguas residuales con altas cargas de contaminantes. Ejerciendo probablemente funciones similares en condiciones completamente diferentes. Especies de *Bacillus* se distribuyen ampliamente en polvo, suelos, ríos, lagos y sistemas de tratamiento de aguas residuales (Ostos-Ortiz *et al.* 2006, Tobón *et al.* 2017). Lamizadeh *et al.* (2016) aislaron bacterias

fijadoras de suelos salinos y no salinos de Irán, encontrando que el género *Bacillus* fue el más dominante en ambos tipos de suelo. Avellaneda-Torres & Torres-Rojas (2015) reportaron la presencia de géneros de la familia Bacillaceae y Enterobacteriaceae en páramos de Colombia, mostrando una vez más la amplia distribución de estas familias en ecosistemas adversos.

Azotobacter y *Rhizobium* se aislaron de las localidades P, C y ARI. Investigaciones realizadas por Flores-Felix *et al.* (2013) reportaron el aislamiento de *Azotobacter* y *Rhizobium* de rizosfera. La importancia del aislamiento de estos géneros en diferentes ecosistemas radica en los múltiples usos de estos microorganismos para la rehabilitación de ecosistemas. Estos autores proponen el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal como una alternativa, gracias a que las rizobacterias facilitan la disponibilidad de nutrientes en los suelos. Jiménez *et al.* (2011) reportaron veinticuatro morfologías celulares de *Azotobacter*, obtenidas de muestras de rizósfera de cultivos orgánicos de Sogamoso y Tibasosa, Colombia, reporte que deja en evidencia el amplio rango de distribución de rizobacterias del género en suelos colombianos. Pese a la relevancia que tienen las especies del género *Rhizobium* y el conocimiento adquirido de estas especies sobre su metabolismo como fijador de nitrógeno, se requieren más investigaciones enfocadas en la importancia ecológica como microorganismo de vida libre (Murumkar, *et al.* 2014, Flores-Félix *et al.* 2013).

Citrobacter se aisló a partir de la muestra de suelo de la localidad C. Se ha descrito que este género se encuentra asociado a la rizósfera de una gran variedad de plantas. Este resultado concuerda con el reportado

por Habib *et al.* (2016) quienes aislaron cepas de *Citrobacter* y *Bacillus* de rizósfera de cultivos de arroz en Malasia, reportando la capacidad de ambos géneros como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y su importancia en la fijación de nitrógeno.

El género *Klebsiella* se observó en ambos sistemas de tratamiento de aguas residuales, gran variedad de estudios muestran que especies de este género se encuentran habitualmente en ambientes acuáticos y terrestres (suelos), y que la mayoría de sus cepas poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Madigan *et al.* 2011).

Especies del género *Enterobacter* como *Enterobacter aerogenes* habitualmente son aisladas de fuentes hídricas y sistemas de tratamiento de aguas residuales. En esta investigación se aisló de suelos, localidades P y C, y de sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales, ARI. Hallazgos de Kämpfer *et al.* (2005) citado por Egamberdieva *et al.* (2014) indicaron que *E. radicincitans* y *E. cloacae* han sido encontradas en rizósfera de trigo y arroz, promoviendo el crecimiento vegetal en estos cultivos.

El aislamiento de géneros de la familia Enterobacteriaceae (*Enterobacter* y *Escherichia*) provenientes de muestras de suelo de la localidad P representa la oportunidad de obtener una amplia gama de bacterias con potencial en procesos de biofertilización sin afectar la salud de plantas ni animales. Por el contrario, estudios como los realizados por García-Fraile (2012) refutan el uso de especies de enterobacterias como *Escherichia coli*. en biofertilizantes y como promotores de crecimiento vegetal debido a su capacidad de persistir en los alimentos. Los sistemas de tratamiento de aguas residuales

domésticas e industriales representan una fuente de posibles microorganismos fijadores de nitrógeno y depuradores que posiblemente contribuirán en el reuso del agua y en la restauración de suelos (Guadarrama & Galván 2015).

CONCLUSIONES

La fijación biológica de nitrógeno representa una gran alternativa para mejorar las prácticas de producción agrícola. En este estudio se reportó que la clase de las Gammaproteobacterias fue el grupo más representativo, con géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. Y la familia Pseudomonadaceae con el género *Azotobacter*. Se aislaron los géneros *Rhizobium* y *Bacillus*. Los géneros *Escherichia* y *Bacillus*, fueron ubicuos en todos los ecosistemas. *Enterobacter*, *Azotobacter*, y *Rhizobium* se aislaron de las localidades Candelaria, Pueblo Pance y ARI. *Klebsiella* se aisló de ambos sistemas de tratamiento de aguas residuales y, *Citrobacter* de la localidad Candelaria. Los medios de cultivo libres de nitrógeno permitieron el aislamiento de los géneros bacterianos. Medios con diferentes fuentes de carbono, glucosa, maltosa, manitol y piruvato, no mostraron diferencias en la recuperación de fijadoras de nitrógeno. Por otro lado, la mejor recuperación de

bacterias fijadoras de nitrógeno en términos de abundancia, se consiguió con el medio de cultivo RBA. En cuanto a diferencias observadas entre localidades, Candelaria, fue la localidad con mayor abundancia de BFN, seguida por ARI, Pueblo Pance y finalmente, la menor abundancia se observó en la localidad ARD. Los hallazgos de esta investigación son relevantes en la adquisición de conocimientos sobre la diversidad microbiana en ecosistemas del Valle del Cauca, puesto que estos microorganismos son potenciales inóculos para el mejoramiento de cultivos de importancia en la alimentación humana y en bioprospección biotecnológica.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Valle, por sentar las bases teóricas en mi formación como profesional, al Laboratorio de Microbiología y al grupo de investigación GAOX, por ser el sitio donde desarrollé la parte experimental y quienes con sus aportes ayudaron al desarrollo de mi trabajo. A mis directores de tesis por su acompañamiento y enseñanzas a lo largo de la investigación. Al laboratorio de docencia de Biología por permitirme el uso de las instalaciones. Al docente Oscar Murillo por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

LITERATURA CITADA

Ansola, G. Arroyo, P. and Sáenz, L. (2014). "Science of the Total Environment Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands". *Science of the Total Environment, The*, Vol. 473–474, pp.63–71.

- Avellaneda-Torres, L. M., & Torres-Rojas, E. (2015). "Biodiversidad de grupos funcionales de microorganismos asociados a suelos bajo cultivo de papa, ganadería y páramo en el Parque Nacional Natural de Los Nevados, Colombia". *Biota Colombiana*, Vol.16(1), pp. 78-87.
- Baldani, J.I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H. and Baldani, V. L. D. (2014). "The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists". *Plant and Soil*, Vol. 384(1–2), pp.413–431.
- Behrendt, U., Schumann, P., Stieglmeier, M., Pukall, R., Augustin, J., Spröer, C. and Ulrich, A. (2010). "Characterization of heterotrophic nitrifying bacteria with respiratory ammonification and denitrification activity—Description of *Paenibacillus uliginis* sp. nov., an inhabitant of fen peat soil and *Paenibacillus purispatii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly clean room". *Systematic and applied microbiology*, Vol. 33(6), pp. 328-336.
- Beneduzi, A. Moreira, F., Costa, P., Vargas, L., Lisboa, B., Favreto, R., Baldani, J. and Passaglia, L. (2013). "Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil". *Applied Soil Ecology*, 63, pp. 94-104.
- Bentzon-Tilia, M., Severin, I., Hansen, L. H. and Riemann, L. (2015). "Genomics and ecophysiology of heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from estuarine surface water". *MBio*, Vol. 6(4), e00929-15.
- Dadook, M., Mehrabian, S., Salehi, M. and Irian, S. (2014). "Morphological , Biochemical and Molecular Characterization of Twelve Nitrogen-Fixing Bacteria and Their Response to Various Zinc Concentration", *Jundishapur Journal of Microbiology*, Vol. 7(4), pp.1–6.
- Dos Santos, P.C., Fang, Z., Mason, S., Setubal, J. and Dixon, R. (2012). "Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes". *BMC Genomics*, Vol.13(1), pp.162.
- Egamberdieva, D., Botir, H., Hashem, A., & Abd-Allah, E. F. (2014). "Characterization of salt tolerant *Enterobacter hormaechei* strain associated with tomato root grown in arid saline soil". *J. Pure Appl. Microbiol*, Vol. 8(5), pp. 4231-4239.
- Flores-Félix, D., Menéndez, E., Rivera, L., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P., Martínez-Molina, E., Velázquez, M., García-Fraile, P. and Rivas, R. (2013). "Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops", *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Vol. 176(6), pp.876–882.
- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M., Flores-Félix, J., Fernández, M., Mateos, P., Rivas, R., Igual, J., Martínez-Molina, E., Peix, A. and Velázquez, E. (2012). "Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans", *PLoS ONE*, Vol. 7(5).
- Garrrity, G., Staley, J. T., Boone, D. R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F. A. and Schleifer, K.H. (2006). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria*. 2nd ed., Springer Science & Business Media, East Lansing, Michigan.
- Guadarrama, B.M. & Galván, F.A., (2015). "Impacto del uso de agua residual en la agricultura". *Revista Iberoamericana de las ciencias biológicas y agropecuarias*, Vol. 4.

- Gutiérrez-Rojas, I., Torres-Geraldo, A.B. and Moreno-sarmiento, N. (2011). "Optimising carbon and nitrogen sources for *Azotobacter chroococcum* growth". *Journal of Biotechnology*, Vol. 10(15), pp.2951–2958.
- Habib, S. H., Saud, H. M., Ismail, M. R. and Kausar, H. (2016). "Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice". *International Journal of Agriculture and Biology*, Vol. 18(1), 184-191.
- Hoffman, B.M. Lukoyanov, D., Yang, Z., Dean, D. and Seefeldt, L. (2014). "Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage". *Chemical Reviews*, Vol. 114(8), pp.4041–4062.
- Howard, J.B. and Rees, D.C. (1996). "Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation", *Chemical Reviews*, Vol. 96(7), pp.2965–2982.
- Hungria, M., Nogueira, M.A. and Araujo, R.S. (2013). "Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability", *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 49(7), pp.791–801.
- Imhoff, J. F. (2005). "Enterobacteriales". In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer US, Germany.
- Jimenez, D.J., Montaha, J.S. and Martinez, M.M. (2011). "Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus", *Brazilian Journal of Microbiology*, pp.846–858.
- Krapp, A. (2015). "Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces", *Current opinion in plant biology*, Vol. 25, pp.115–122.
- Kuever, J.F.A.R. and Widdel, F. (2006). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria", In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*.
- Lagurara, P. (2014). *Caracterización fenotípica de rizobios presentes en el parque Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay*, Tesis de pregrado, Universidad de la República.
- Lamizadeh, E., Enayatizamir, N. and Motamedi, H. (2016). "Isolation and Identification of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) from the Rhizosphere of Sugarcane in Saline and Non-Saline Soil", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Vol. 5(10), pp.1072–1083.
- Leibniz Association (2016). Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. [Online]. Available from <https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium441.pdf>[10 Marzo 2017]
- Ledesma, C., Bonansea, M., Rodriguez, C. & Sánchez, A. (2013). "Determinación de indicadores de eutrofización en el embalse Río Tercero, Cordoba (Argentina)", *Revista Ciencia Agronómica*, Vol. 44(3), pp.419–425.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). *Brock Biology of microorganisms 12th edn*. Int. Microbiol.
- Mantilla, C.L., Anaya, M.V. & Zumaqué, L.E.O. (2007). "Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia". *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 9(2), pp.6–14.
- Mirza, B.S. and Rodrigues, J.L.M. (2012). "Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 78(16), pp.5542–5549.
- Moure, V.R., Danyal, K., Yang, Z., Wendroth, S., Müller-Santos, M., Pedrosa, F., Scarduelli, M., Gerhardt, E., Huergo, L., Souza, E. and Seefeldt, L. (2013). "The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase adpribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein glbN", *Journal of Bacteriology*, Vol. 195(2), pp.279–286.
- Murumkar, D.R., Borkar, S.G. and Chimote, V.P. (2014). "Spatial diversity of free living Rhizobia present in rhizosphere soils of six different physiographic regions of Maharashtra, India", *Legume Research*, Vol. 37(2), pp.165–174.
- Núñez, L. (2012). *Fijación de nitrógeno en soja (Glycine max L . Merr.) inoculada con cepas comerciales de Bradyrhizobium elkanii y B . japonicum*", Tesis de pregrado, Universidad de la República.
- Ostos Ortiz, O. L., Benavides López de Mesa, J. & Quintero, G. (2006). "Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla en la Laguna de Tota, Boyacá, Colombia" *NOVA*, Vol. 4(6).
- Pires, M.V. da Cunha, D., de Matos, S. and Heil, M. (2015). "Nitrogen-Use Efficiency, Nitrous Oxide Emissions, and Cereal Production in Brazil: Current Trends and Forecasts", *Plos One*, Vol. 10.
- R Development Core Team. (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rodríguez, O. (2014). *Biofertilización de Nitrógeno en suelos salinos a partir de consorcios microbianos obtenidos de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas*, Tesis de Maestría, Universidad del Valle.
- Rojas Triviño, A. (2011). *Conceptos y práctica de Microbiología general*.
- de Souza, R., Ambrosini, A. & Passaglia, L.M.P. (2015). "Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils". *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 38(4), pp.401–419.
- Sullivan, B. W., Smith, W. K., Townsend, A. R., Nasto, M. K., Reed, S. C., Chazdon, R. L. and Cleveland, C. C. (2014). "Spatially robust estimates of biological nitrogen (N) fixation imply substantial human alteration of the tropical N cycle", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 111(22), pp. 8101-8106.

- Tallent, S. M., Kotewicz, K. M., Strain, E. A. and Bennett, R. W. (2012). "Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group". *Journal of AOAC International*, Vol. 95(2), pp. 446-451.
- Tobón, S. R., Cadavid, R. M. A., & Builes, L. A. G. (2017). "Patógenos Microbianos e Indicadores Microbiológicos de calidad del agua para consumo humano". *Facultad Nacional de Salud Pública*, Vol. 35(2).
- Torres, C (2014). Guia de laboratorio de microbiología general. Universidad del Valle.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. & Whitman, W. (Eds.). (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, Athens, Georgia.
- Zhao, J., Zhu, D., Fan, J., Hua, Y. and Zhou, W. (2015). "Seasonal variation of ANAMMOX and denitrification in sediments of two eutrophic urban lakes", *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 24(6), 2779-2783.