

**IDENTIFICACIÓN DE GENES *nifH* Y PRODUCCIÓN DE ACIDO INDOL ACETICO EN
CEPAS NATIVAS DE AZOTOBACTER**

NATALY ALARCÓN CEPEDA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

**MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA Y VETERINARIA**

DIRECTOR:

JOSÉ SALVADOR MONTAÑA

CODIRECTOR:

DIEGO JAVIER JIMÉNEZ

BOGOTÁ D.C. DICIEMBRE DE 2009

**IDENTIFICACIÓN DE GENES *nifH* Y PRODUCCIÓN DE ACIDO INDOL ACETICO EN
CEPAS NATIVAS DE AZOTOBACTER**

NATALY ALARCÓN CEPEDA

DIRECTOR:

JOSÉ SALVADOR MONTAÑA

CODIRECTOR:

DIEGO JAVIER JIMÉNEZ

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR A LOS TÍTULOS DE**

**MICROBIOLOGO INDUSTRIAL
MUCROBIOLOGO AGRÍCOLA Y VETERINARIO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS**

BOGOTÁ D.C. DICIEMBRE DE 2009

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos omitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo se velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo en buscar la verdad y la justicia”

**IDENTIFICACIÓN DE GENES *nifH* Y PRODUCCIÓN DE ACIDO INDOL ACETICO EN
CEPAS NATIVAS DE AZOTOBACTER**

NATALY ALARCÓN CEPEDA

APROBADO

**_____
JOSÉ SALVADOR MONTAÑA**

DIRECTOR

**_____
DIEGO JAVIER JIMÉNEZ**

CODIRECTOR

**_____
MARIA XIMENA RODRIGUEZ**

JURADO

**IDENTIFICACIÓN DE GENES *nifH* Y PRODUCCIÓN DE ACIDO INDOL ACETICO EN
CEPAS NATIVAS DE AZOTOBACTER**

NATALY ALARCÓN CEPEDA

APROBADO

**INGRID SCHULER PhD
DECANO ACADÉMICO**

**JANETH ARIAS PALACIOS MSc
DIRECTOR DE CARRERA**

DEDICATORIA

A mi familia que me apoyo durante toda esta etapa de la universidad, a mis padres que siempre fueron y son mi gran motivación para seguir esforzándome por ser cada día mejor.

AGRADECIMIENTOS

A Ivonne Baltzer por su valiosa sugerencia de mi participación en el presente proyecto

A mis directores de trabajo de grado José Salvador Montaña y Diego Jiménez por compartir conmigo sus conocimientos y ayudarme a crecer como profesional y como persona. Gracias por su apoyo y por confiar en mí.

Gracias al laboratorio de Microbiología ambiental y Gebix por facilitarme las herramientas necesarias para llevar a cabo el proyecto

A mis padres por confiar en mí, por darme ese amor que solo se encuentra en una familia como la nuestra, gracias por compartir los buenos y malos días, gracias por darme la oportunidad de estudiar y buscar siempre lo mejor para mi vida.

A Felipe por creer en mí y apoyarme durante esta etapa de mi vida.

A Cindy por ser una amiga incondicional, gracias por compartir conmigo esta etapa de la universidad, gracias porque nunca nos dimos por vencido y sacamos todo adelante con mucho esfuerzo.

A Caro, Ruth, Ana, Ricardo, Andrés, Cris, y todos los que hacen falta, porque juntos sacamos esto adelante, gracias por el apoyo y los momentos vividos.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÒRICO.....	3
2.1. Uso de bacterias fijadoras de nitrógeno en la agricultura.....	4
2.2. Estrategias para la fijación de Nitrógeno.....	4
2.2.1. Fijación Simbiótica de Nitrógeno.....	4
2.2.2. Fijación Asimbiótica de Nitrógeno.....	5
2.3. Importancia del género <i>Azotobacter</i>	5
2.4. Complejo Nitrogenasa y fijación de nitrógeno.....	6
2.5. Herramientas para la caracterización molecular de <i>Azotobacter</i> sp.....	7
2.5.1. Análisis del gen ribosomal 16S.....	7
2.5.2. Análisis de los genes funcionales <i>nifH</i>	7
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	9
4. OBJETIVOS.....	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1. Cepa control.....	11
5.2. Reconstitución de la cepa.....	11
5.3. Siembra en medio específico.....	11

5.4. Extracción de DNA.....	12
5.5. Determinación de la cantidad, pureza y calidad del DNA.....	13
5.6. Amplificación del gen funcional <i>nifH</i>	14
5.7. Caracterización fisiológica de los aislamientos.....	14
5.7.1. Producción de ácido indol acético (AIA).....	14
6. RESULTADOS	15
6.1. Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	15
6.2. Caracterización fisiológica de los aislamientos.....	15
6.2.1. Cuantificación de la producción de AIA de cada aislamiento.....	15
6.2.2. Extracción de DNA.....	16
6.3 Amplificación del gen funcional <i>nifH</i>	16
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	17
8. CONCLUSIONES.....	20
9. REFERENCIAS.....	21
10. ANEXOS.....	26

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

		Pág.
Tabla 1	Cuantificación de la producción de AIA de cada aislamiento	15
Figura 1	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA de 9 cepas fijadoras de nitrógeno.	16
Figura 2	Amplificación del gen funcional <i>nifH</i> en 9 aislamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno.	17

TABLA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Medio de cultivo Ashby	31
Anexo 2	Composición de medio BT	31
Anexo 3	Composición de TE 1X	31
Anexo 4	Preparación de Fenol Cloroformo Isoamílico (FCI) (25:24:1)	31
Anexo 5	Curva Pratrón AIA	32
Anexo 6	Análisis de varianza, agrupación de Duncan	33
Anexo 7	Agrupamiento de los aislamientos obtenido a partir de un análisis de restricción del gen ribosomal 16S (Jiménez, 2007)	34

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la capacidad de producción de Ácido Indol Acético (AIA) e identificar la presencia del gen *nifH* en cepas nativas fijadoras de nitrógeno se reconstituyeron en medio Ashby las cepas (C1Z, C2Z, C1E, C2E, C3E, C4E, C5E, C1T, C2T, C3T, C4T, C5T, C1BR, C2BR, C3BR, C4BR, C5BR, CT, C1CO, C4CO, C5CO, C1CA, C3CA, C4CA y C5CA) aisladas previamente por Jiménez, 2007, adicionalmente se realizó una fermentación discontinua en medio BT durante cuatro días para inducir la producción de AIA y se cuantificó la cantidad producida de cada cepa utilizando el reactivo de Salkowsky, encontrándose diferencias significativas entre las cepas evaluadas respecto a la concentración de AIA y se determinó que en los aislamientos C1CA, C1E, C4E y C4T se obtuvieron las mayores concentraciones producidas.

Complementariamente, se pudo confirmar mediante la evaluación de la producción de AIA que las cepas C1CA, C1E y C4T pertenecientes al grupo I del ARDRA corresponden a bacterias de la especie *A. vinelandii*.

Para identificar la presencia del gen *nifH* se realizó la extracción de ADN de cada una de las 25 cepas y posteriormente se realizó una PCR para la amplificación del gen funcional *nifH* utilizando los primers for A y rev. De la cual solo se obtuvo banda de amplificación en 9 de las 25 muestras analizadas (ATCC, C2E, C1T, C5E, C3BR, C5CA, C1CA, C3E y C4T).

ABSTRACT

With the aim to evaluate the production of Indole Acetic Acid (IAA) and the presence of *nifH* gene in indigenous fixing nitrogen isolates, these were isolated in Ashby medium (C1Z, C2Z, C1E, C2E, C3E, C4E, C5E, C1T, C2T, C3T, C4T, C5T, C1BR, C2BR, C3BR, C4BR, C5BR, CT, C1CO, C4CO, C5CO, C1CA, C3CA, C4CA and C5CA), these isolates were previously isolated by Jiménez, 2007. Moreover, there were made a batch culture using BT medium to induce the production of IAA and it was quantified using Salkowsky reagent. It was found significantly differences between the isolations and it was determined that C1CA, C1E, C4E and C4T produced the major quantity of IAA.

In addition, it was confirmed through evaluation of IAA production that isolations C1CA, C1E and C4T, which belong to group I of ARDRA, correspond to *A. vinelandii* species.

In order to identify the presence of *nifH* gene it was made the DNA extraction of each isolation, after that, it was made a PCR to amplified the functional *nifH* gene using for A and Rev primers. From this process it was obtained 9 amplification bands of the 25 samples analyzed (ATCC, C2E, C1T, C5E, C3BR, C5CA, C1CA, C3E and C4T).

1. INTRODUCCIÓN

Desde que la revolución verde se desarrolló en Colombia, se han incrementado el uso de técnicas agrícolas para mejorar el rendimiento de los cultivos. La implementación de monocultivos, fertilizantes químicos y abonos para mejorar la productividad del cultivo y la fertilidad del suelo causan efectos nocivos para el ambiente, como la acumulación de nitratos en el suelo que se movilizan hacia aguas subterráneas por lixiviación, así como eutrofización de ecosistemas acuáticos, entre otros.

Es por esto que se hace necesario en los cultivos colombianos el desarrollo de esquemas de agricultura sostenible amigables con el medio ambiente. Como respuesta a esta necesidad, se han realizado investigaciones sobre microorganismos promisorios capaces de promover el crecimiento vegetal, por la producción de diferentes metabolitos que generan una respuesta benéfica en la planta y en su entorno, sin generar un impacto negativo en el ambiente.

Las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) y las micorrizas arbusculares son los principales componentes biológicos usados para la elaboración de inoculantes microbianos ya que mejoran la asimilación de nutrientes de la planta y por lo tanto pueden aumentar la eficiencia de los fertilizantes químicos y abonos. Dentro de las PGPR se encuentran bacterias fijadoras de nitrógeno que juegan un papel fundamental dentro de los agroecosistemas, ya que se ha demostrado que el nitrógeno es uno de los factores limitantes para el adecuado desarrollo de las plantas en algunos cultivos; la explicación radica en que el nitrógeno molecular no puede ser asimilado directamente por las plantas, sin embargo, éste se transforma en una molécula de nitrógeno asimilable por medio del proceso de fijación biológica que solo realizan algunas bacterias, como las de la familia *Azotobacteraceae*.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, como *Azotobacter sp.*, tienen un efecto positivo en el ambiente en el que se encuentran ya que degradan plaguicidas, aumentan la solubilización del fósforo orgánico e inorgánico del suelo, son promotores de crecimiento vegetal, producen sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, entre otras, manifestándose en plantas sanas que se desarrollan adecuadamente y en un aumento en la productividad de los cultivos. La familia *Azotobacteraceae* se encuentra representada por bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre, que se encuentran presentes en el suelo cerca a las raíces de las

plantas así como en hábitats acuáticos. *Azotobacter* spp. y *Azomonas* spp. son los dos géneros representantes, y han sido ampliamente analizados para la elaboración de bioinoculantes en cultivos debido a sus facultades en el mejoramiento del desarrollo de las plantas.

La taxonomía de la familia *Azotobacteraceae* se ha realizado tradicionalmente a través de análisis morfológicos y fisiológicos. En el caso de *Azotobacter* sp, microscópicamente se observa bajo la coloración de Gram como bacilos Gram negativos, en algunas ocasiones se pueden observar pequeñas cadenas de bacilos, y en cultivos viejos se observan quistes que producen como estructura de resistencia; con el fin de confirmar su ubicación taxonómica e inclusive para su identificación se realizan pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, reducción del nitrato, utilización de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes entre otros. Actualmente, una de las formas más confiables para la identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno es mediante el empleo de herramientas moleculares que permiten analizar de una manera más detallada la taxonomía de este grupo.

Una de las técnicas moleculares más utilizada es el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S que ha sido una herramienta poderosa para esclarecer la filogenia y taxonomía de la mayoría de bacterias. Sin embargo, la caracterización de genes funcionales como aquellos que están involucrados en la fijación de nitrógeno, puede suministrar información más específica acerca de la capacidad metabólica y la filogenia de los microorganismos fijadores de nitrógeno. Dentro de los grupos de genes funcionales de las bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentra el operon *nifHDK* del cual se generan los componentes I y II de la nitrogenasa. El complejo nitrogenasa es el encargado de la fijación del nitrógeno atmosférico realizando un proceso de reducción del nitrógeno molecular hasta transformarlo en amonio.

En este trabajo se utilizó el gen funcional *nifH* codificante de la dinitrogenasa reductasa para identificar cepas nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno. Este gen presenta al igual que el gen ribosomal 16S, secuencias conservadas que permiten comparar filotipos de bacterias diazótroficas y de esta forma establecer la relación con los patrones de agrupamiento obtenidos previamente con base en el análisis del gen ribosomal 16S. Se encuentra documentado que las bacterias diazótroficas son buenas productoras de fitohormonas por esta razón en este trabajo se evaluó la capacidad de las cepas nativas fijadoras de nitrógeno para producir AIA, ya que esta se encuentra involucrada en el aumento de la productividad vegetal.

2. MARCO TEORICO

Dentro del contexto histórico de la agricultura colombiana el problema del uso indiscriminado de productos químicos surge entre los años 1960 y 1970 cuando aparece la revolución verde como respuesta a las grandes demandas de alimentos debido al incremento incesante de la población mundial. Esta revolución se basa en la implementación de monocultivos, en la mecanización y en el empleo masivo de fertilizantes químicos, aplicación de herbicidas y pesticidas (Ruiz, 2002).

Los fertilizantes químicos son aquellos en los que los nutrientes básicos se presentan como sales inorgánicas obtenidas por extracción o por procesos industriales físicos o químicos (NTC1927, 2001), buscan mejorar el rendimiento y la cantidad de producción de la planta dejando en un segundo plano la calidad del cultivo. De esta manera, el uso inadecuado de estos productos ha producido desde entonces efectos negativos en el ambiente, como: 1) Erosión del suelo que anteriormente era fértil, 2) Salinización, 3) Pérdida de biodiversidad genética, 4) Contaminación de aguas superficiales, lagos, ríos etc., y 5) compactación del suelo (Corrales, 2003; Gliessman, 1997; Ruiz, 2002; Silguy, 1999)

Bajo esta perspectiva, se han buscado nuevas formas de fertilización que no generen un impacto nocivo en el ambiente. Como por ejemplo, implementar la utilización de bioinoculantes en los cultivos colombianos para desarrollar una agricultura sostenible.

Esencialmente, un bioinoculante está definido como una sustancia producida a partir de sustratos orgánicos, cuya acción potencia el metabolismo de microorganismos que poseen una función determinada. (ICA, 2006); para la elaboración de éstos se utilizan rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Adesemoye y Kloepper, 2009), definidas como bacterias de crecimiento libre que colonizan la superficie de las raíces y contribuyen al crecimiento de las plantas por mecanismos directos como la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas y el mejoramiento de la nutrición de la planta. Las PGPR aumentan la concentración de fósforo disponible para las plantas debido a procesos de solubilización de fosfatos inorgánicos y a la producción de sideróforos quelantes del hierro (Ryu et al., 2003 y 2004). Indirectamente, las PGPR benefician el crecimiento de las plantas por interacciones biológicas como el antagonismo, parasitismo, antibiosis, competición por nutrientes y espacio con microorganismos que pueden inhibir el crecimiento de las plantas e incluso ser patógenas. (Rao y Kishore, 2006)

2.1 Uso de bacterias fijadoras de nitrógeno en la agricultura

Como una alternativa al uso de fertilizantes químicos, se han desarrollado una serie de estudios para la implementación de biofertilización (Hernández, 2009) que aporten al desarrollo sostenible y ecológico de los cultivos sin causar ningún efecto negativo en el ambiente.

Este tipo de biofertilización a diferencia de los fertilizantes inorgánicos no causa efectos perjudiciales al ambiente ya que las bacterias diazótroficas se sitúan principalmente en la rizósfera de la planta por lo que le proveen el nitrógeno que necesitan para desarrollarse, no generan acumulación de nitrógeno en el suelo como sucede con la otra forma de fertilización. Se estima que un 45% a 50% de los agroquímicos adicionados al suelo se pierden por procesos naturales de lixiviación y desnitrificación; durante el proceso de lixiviación se transportan nutrientes, cationes básicos y pesticidas (Hernandez, 2009; Tapia *et al.*, 2007). El porcentaje que se pierde por escorrentía puede llegar a convertirse en fuente de contaminación para aguas subterráneas, lagos, ríos, etc., por lo tanto resultar siendo perjudicial para el bienestar del ecosistema, los animales y el ser humano (Ritter *et al.*, 2005).

Para la elaboración de biofertilizantes se han empleado principalmente los microorganismos pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Azotobacter*

2.2 Estrategias para la fijación de Nitrógeno

La fijación biológica de Nitrógeno atmosférico puede llevarse a cabo de forma Simbiótica o Asimbiótica

2.2.1 Fijación Simbiótica de Nitrógeno

Inicialmente una relación simbiótica es aquella que beneficia mutuamente a dos organismos distintos. Así, la relación entre las plantas leguminosas y las bacterias que desarrollan nódulos en sus raíces, es una relación simbiótica. Las dos especies (planta-bacteria) interaccionan de tal manera que la planta le provee sustancias orgánicas e inorgánicas a la bacteria y esta última le proporciona nitrógeno. (Mayea *et al.*, 1991)

La mayoría de las especies de la familia *Leguminosae* forman asociación, especialmente frecuente en las subfamilias *Papilionoideae* y *Mimosoideae* y escasa en *Cesalpinoideae*.

En las raíces de estas plantas aparecen cuando son infectadas por *Rhizobium* unas tumoraciones de distinta forma y tamaño, nódulos donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Olivares, 2008)

2.2.2 Fijación Asimbiótica de Nitrógeno

Los principales microorganismos que realizan este proceso son los pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azotomonas*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Desulfomonas*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella pneumoniae*. (Rodríguez et al., 2003)

Estos microorganismos de vida libre están asociados a las partículas del suelo e interactúan con las plantas ya que se encuentran situados en la rizósfera donde los gránulos de suelo se encuentran adheridos a las raíces. Los microorganismos fijan nitrógeno que puede ser utilizado por la planta para realizar sus procesos de desarrollo. (Peña y Reyes, 2007)

2.3 Importancia del género *Azotobacter*

Azotobacter es uno de los géneros pertenecientes a la familia *Azotobacteraceae*, se encuentran en la subdivisión alfa de las Proteobacterias. Se pueden encontrar en diversos ambientes como en suelo y agua. Son quimioheterótrofos, aerobios, tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de forma no simbiótica en bajas tensiones de oxígeno, su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C, además poseen un rango de pH relativamente amplio para su crecimiento, oscila entre un pH de 4.8 y 8.5. Microscópicamente se observan como bacilos Gram negativos y Gram variables bajo la coloración de Gram, las células normalmente están organizadas en parejas o en cadenas cortas, cada una de éstas tiene un tamaño de aproximadamente 2 µm a 4 µm, siendo las de mayor tamaño las células de *Azotobacter chroococcum*. Adicionalmente, forman quistes como estructuras de resistencia, son fisiológica y citológicamente diferentes a las células vegetativas. Pueden ser observadas en cultivos viejos o inducir se producción en medios libres de nitrógeno suplementados con alcohol butílico. También presentan inclusiones intracelulares de poli-β-hidroxibutiratos como reserva de carbono. Macroscópicamente, se observan como colonias mucoides, en estados iniciales son traslúcidas y posteriormente toman un coloración opaca, dependiendo de la especie de *Azotobacter* producen pigmentos en medios libres de nitrógeno adicionados con benzoato. Bioquímicamente, son oxidasa y catalasa positivo, producen sulfuro de hidrógeno e hidrolizan el almidón. (Hendrik, 2006; Pequeño, 1969; Soma et al., 1997)

Es una bacteria que produce hormonas de crecimiento vegetal como auxinas, compuestos fenólicos (Jackson *et al.*, 1964; Roldán *et al.*, 1997) giberelinas, citoquinas, entre otras, por lo tanto se comporta como promotor de crecimiento vegetal, además incrementa la velocidad de germinación de semillas, estimula la formación de raíces, fortalece los mecanismos naturales de defensa de la planta ya que induce resistencia sistémica, incrementa la respuesta a la fertilización química u orgánica, reduce las pérdidas de nitrógeno por lavado, aumenta la tolerancia al estrés hídrico y al ataque de plagas o enfermedades (Fornasero *et al.*, 2009), adicionalmente, *Azotobacter* produce sustancias antifúngicas que juegan un papel importante para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Poly *et al.*, (2001) establecen que los organismos diazotrofos del suelo son la fuente más importante de nitrógeno dentro de los ecosistemas de producción primarios.

2.4 Complejo Nitrogenasa y fijación de nitrógeno

La nitrogenasa es un sistema compuesto por dos proteínas que catalizan la reducción del nitrógeno atmosférico hasta transformarlo en amonio. El triple enlace de la molécula ($N\equiv N$) tiene una energía de 950 KJ/mol por lo que es necesario un alto gasto energético (entre 18 y 24 ATP) en el proceso de reducción. (Lañez, 2005; Rees y Howard, 2000)

El complejo nitrogenasa está formado por dos metaloproteínas: el componente I (240 kDa) y el componente II (60kDa) (Lei *et al.*, 2000); el primero conocido también como dinitrogenasa o proteína MoFe dependiente de Molibdeno, es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades alfa (α_2) y dos subunidades beta (β_2) que a su vez son codificadas por los genes *nifD* y *nifK* respectivamente. Las subunidades α y β muestran pliegues de polipéptidos similares y algunas extra hélices. Ligado al componente I se encuentra la dinitrogenasa reductasa o proteína Fe (componente II), contiene un centro activo compuesto por cuatro moléculas de hierro y cuatro de azufre (4Fe-4S) encargado de donar los electrones al sustrato, es un homodímero con dos subunidades idénticas codificadas por los genes *nifH* (Hendrik, 2006; Rees y Howard, 2000; Young, 2005)

Los genes que codifican las subunidades del complejo nitrogenasa se encuentran en un cluster dentro del genoma, usualmente en un orden característico. De acuerdo a su organización originan tres tipos de nitrogenasa, A, B y C. (Young, 2005)

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico se distribuye ampliamente a nivel taxonómico, presentándose algunas diferencias entre las nitrogenasas codificadas por los distintos

microorganismos. Este complejo nitrogenasa se encuentra en mayor proporción en el dominio bacteria y en algunas especies de archeas metanogénicas. (Young, 2005)

Las enzimas nitrogenasas son muy similares entre sí. Estudios filogenéticos han demostrado que se derivan de un ancestro común, no obstante sus diferencias pueden deberse a la transferencia horizontal del material genético o por una pérdida independiente de información genética en algunos linajes. (Young, 2005)

Dentro de la filogenia de las nitrogenasas existen ramificaciones notorias pero la organización de las subunidades son casi invariables, por lo tanto hay suficientes características conservadas para guiar un lineamiento de las secuencias de cada uno de los polipéptidos de las subunidades (Young, 2005)

2.5 Herramientas para la caracterización molecular de *Azotobacter* sp.

2.5.1 Análisis del gen ribosomal 16S

Los genes ribosomales de la subunidad pequeña (rRNA 16S) son excelentes marcadores para realizar estudios filogenéticos ya que brindan la información necesaria para la clasificación e identificación de bacterias. Las características que los definen como marcadores confiables son; a) a diferencia de otros tipos de RNA celular, el rRNA posee hasta más de 16.000 copias necesarias para la síntesis de proteínas, b) son ubicuos, c) su estructura y función es constante, d) presenta regiones comunes en todos los organismos ya que son altamente conservados, sin embargo, contiene sitios específicos donde se concentran variaciones entre las secuencias (Rodicio y Mendoza, 2004; Schmid y Hartmann, 2007)

2.5.2 Análisis de los genes funcionales *nifH*

Para la caracterización molecular de los genes funcionales de microorganismos fijadores de nitrógeno, como *Azotobacter* sp., se ha usado ampliamente como marcador el operón *nifHDK* debido a que posee secuencias considerablemente conservadas lo que le otorga la propiedad para realizar estudios de filogenia y taxonomía. (Schmid y Hartmann, 2007)

El gen *nifH* es ampliamente utilizado para estudios de diversidad. Para esto, los genes son obtenidos a partir de la clonación y amplificación de las secuencias de organismos en los cuales se ha demostrado su capacidad para fijar nitrógeno experimentalmente (Young, 2005)

Varias técnicas son ampliamente utilizadas para el análisis de genes *nifH* como PCR, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), RFLP (PCR restriction fragment length polymorphism) y FLT-RFLP (fluorescently labeled terminal) (Poly *et al.*, 2001).

A diferencia de los análisis filogenéticos basados en las secuencias del RNA ribosomal 16S (SSU rRNA) la filogenia a partir de las secuencias de la nitrogenasa permite observar una relación más específica entre las diferentes especies de organismos diazotróficos, por lo tanto es una herramienta para lograr un mejor entendimiento de los árboles filogenéticos obtenidos con SSU rRNA (Cole *et al.*, 2003)

Es importante comparar la filogenia realizada a partir de RNAr y de los genes *nifH* para evaluar las discordancias o similitudes entre las secuencias obtenidas de cada una, estas comparaciones son útiles para la identificación de bacterias diazótroficas en un suelo de uso agrícola, con el fin de determinar la biodiversidad existente de estas bacterias y proporcionar las condiciones adecuadas para su crecimiento, incluso para la elaboración de biofertilizantes con esas cepas autóctonas.

Jiménez, (2007) en investigaciones anteriores realizó una caracterización molecular de cepas nativas colombianas utilizando como marcador molecular el gen ribosomal 16S, en donde se evidenciaron variaciones en los morfotipos de las cepas analizadas permitiendo identificar algunas de éstas bacterias.

Poly *et al.*, (2001) determinó que existían algunas variaciones entre secuencias del gen *nifH* provenientes de ambientes marinos respecto a las que provenían del suelo. Por otro lado, Hamelin *et al.*, se basó en la clonación del gen *nifH* para realizar un estudio de diversidad genética de la rizósfera de *Molinilia coerulea*, encontrando que una secuencia de *nifH* era dominante respecto a las demás (*Azotobacter vinelandii*). En otros estudios, Aziz *et al.*, realizaron un estudio comparativo entre los filotipos *nifH* y los ribotipos RNAr de una comunidad de cianobacterias, encontrando que no había gran variabilidad de especies en esta comunidad.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Tradicionalmente la caracterización y filogenia de grupos funcionales de microorganismos como los fijadores de nitrógeno se han basado en análisis morfológicos y fisiológicos, entre otros. Sin embargo estos análisis no son suficientes ni completamente confiables ya que pueden arrojar resultados ambiguos por la gran similitud que existe macroscópica y microscópicamente entre diferentes géneros y especies de bacterias fijadoras de nitrógeno, por lo tanto se hace necesario el uso de herramientas moleculares que proporcionan resultados más confiables sobre la identidad del microorganismo, adicionalmente puede ser utilizada para estudios filogenéticos. La caracterización del gen funcional *nifH* es utilizada extensamente en estudios de filogenia de organismos diazótrofos porque es un marcador conservado que permite el análisis entre diferentes filotipos. Adicionalmente, es una herramienta que permite soportar o discutir los resultados obtenidos previamente, relacionados con la caracterización de bacterias diazótrofes empleando el gen ribosomal 16S.

Por otro lado, una forma de complementar la caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno que pueden ser utilizadas como biofertilizantes es por medio de la evaluación de sus características fisiológicas, en el caso de *Azotobacter*, por la capacidad de producir promotores de crecimiento vegetal como el AIA. Este trabajo pretende ampliar la caracterización de los aislamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno y establecer la posible relación entre su ubicación taxonómica y la capacidad de producir AIA. Los resultados de este trabajo pueden contribuir en la selección de cepas promotoras del crecimiento vegetal que pueden ser utilizadas en programas de biofertilización.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de producción de Acido Indol Acetico (AIA) e identificar la presencia del gen *nifH* en cepas nativas fijadoras de nitrógeno

4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la producción de Acido Indol Acetico (AIA) en aislamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno.
- Amplificar el gen *nifH* en diferentes aislamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno empleando iniciadores degenerados
- Comparar los resultados de la amplificación de genes *nifH* con los obtenidos mediante la amplificación del gen 16S rDNA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reconstitución de las cepas

Se utilizaron 25 cepas nativas (C1Z, C2Z, C1E, C2E, C3E, C4E, C5E, C1T, C2T, C3T, C4T, C5T, C1BR, C2BR, C3BR, C4BR, C5BR, CT, C1CO, C4CO, C5CO, C1CA, C3CA, C4CA y C5CA) aisladas previamente por Jiménez, 2007 a partir de suelos de cultivos de Zanahoria (Z), Espinaca (E), Tomate (T), Brócoli (BR), Calabacín (CA) y Coliflor (CO) y una cepa control de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518, fueron resuspendidas en 10 ml de caldo nutritivo en tubos falcon de 50 ml y se llevaron a incubar de forma inclinada durante 24 horas a temperatura ambiente y 150 rpm.

5.2 Siembra en medio específico

Para observar las colonias características de *Azotobacter* se tomó una muestra de cada una de las cepas reconstituidas anteriormente y se sembró por agotamiento en cajas de Petri con Agar Ashby Manitol (Anexo1) (Torres *et al.*, 2000) se incubaron por 5 días a 34°C. Posteriormente se observaron las características macroscópicas de las colonias y microscópicas mediante coloración de Gram.

5.3 Caracterización fisiológica de los aislamientos

5.3.1 Evaluación de la producción de ácido indol acético (AIA)

5.3.1.1 Fermentación discontinua

Para evaluar la producción de AIA de cada una de las cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno se preparó un inóculo axénico de cada una de éstas incluyendo la cepa control *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518, utilizando solución salina al 0.85% con el fin de obtener una absorbancia de 0,2 a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Génesis 20 (Celis y Gallardo, 2008).

La fermentación discontinua se llevó a cabo en frascos de vidrio de 100ml con un VET de 20 ml de medio BT (Anexo 2). El inóculo correspondió al 1% del VET. Esto con el fin de obtener una concentración inicial de 10^6 células/ml. El cultivo fue incubado en un agitador de órbita circular INNOVA® 44 a 100 rpm a 16°C durante 4 días (Celis y Gallardo, 2008; Califa y Gonzales, 2009).

Cumplido el cuarto día se procedió a tomar 4,5 ml de caldo de cultivo para centrifugarlos a 4000 rpm por 15 minutos en la centrifuga Clay Adams Dynac III y luego tomar 1500 µl de

sobrenadante para conservarlo en 3 tubos eppendorf y posteriormente centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 5°C en la centrifuga Sorvall Biofuge Primo R. Luego de realizar el proceso de centrifugación se tomaron aproximadamente 1200 µl de sobrenadante en tubos eppendorf que fueron congelados a -20°C hasta la determinación de la concentración AIA (Celis y Gallardo, 2008).

5.3.1.2 Evaluación de la producción de AIA empleando reactivo de Salkowsky

Para la detección y cuantificación de auxinas se utilizó la técnica colorimétrica estandarizada y modificada por Celis y Gallardo (2008) utilizando el reactivo de Salkowsky que utiliza como base para su preparación ácido sulfúrico (H₂SO₄ 7.9M y FeCl₃ 40mM)

5.3.1.3 Curva patrón de AIA

La curva patrón se realizó a partir de una solución stock de Acido Indol Acético comercial grado reactivo (sigma) con una concentración de 100 µg/ml, a partir del cual se elaboraron diferentes concentraciones de AIA (2, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 µg/ml). Para la reacción se utilizaron 500 µl de cada una de las concentraciones y se adicionó 1000 µl del reactivo de Salkowsky (Celis y Gallardo, 2008), luego se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, para su posterior lectura por triplicado a una absorbancia de 530 nm en el espectrofotómetro Génesis 20. A partir de los datos obtenidos se estableció la curva de calibración y la correspondiente ecuación de la recta. (Anexo 3)

5.3.1.4 Cuantificación de la producción de AIA de cada aislamiento

A partir del sobrenadante obtenido con anterioridad (numeral 5.4.1.1) se tomaron 500 µl y se dejaron reaccionar con 1000 µl del reactivo de Salkowsky durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, luego se leyeron las absorbancias de cada caldo de cultivo a 530 nm y se remplazaron estos valores en la ecuación de la recta previamente definida para establecer la concentración de AIA que produjo cada cepa.

5.4 Extracción de DNA

El protocolo que se empleó para la extracción de DNA fue el utilizado por Jiménez, 2007, el cual consiste en: a partir de un cultivo de *Azotobacter* en 5 ml de caldo nutritivo se toman 1.5 ml del cultivo distribuido en dos tubos eppendorf de 1.5 ml los cuales son centrifugados a 13000 rpm durante 2 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 50 µl de TE 1X (Anexo 4) posteriormente se unen las dos suspensiones en un tubo eppendorf de 1.5 ml ; Se agrega 1ml de TE 1X y se lava suavemente, agitando los tubos

para resuspender las células; luego centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos y descartar el sobrenadante; resuspender las células en 350µl de TE 1X y adicionar 5 µl de lisozima (50mg/ml) y 2 µl de RNasa A (10mg/ml); se incuba por 10 minutos a 37°C para adicionarle posteriormente 3 µl de proteinasa K (20mg/ml) y 30 µl de SDS al 10%; Se incuba por 15 minutos a 65°C hasta observar una solución transparente indicando lisis celular; adicionar 350 µl de Fenol Cloroformo Isoamílico (25:24:1) (Anexo 4) y mezclar por inversión 5 veces; seguido a esto se centrifuga el tubo a 13000 rpm durante 7 minutos. Luego de este procedimiento, se transfiere cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf evitando tomar la interfase y el fenol; teniendo esto, se adicionan 350 µl de Cloroformo isoamílico (24:1) se mezcla por inversión 5 veces y se centrifuga a 13000 rpm por 7 minutos. Seguidamente se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml que contiene 1ml de etanol absoluto y se mezcla suavemente hasta observar el material genético suspendido; para luego centrifugarlo a 13000 rpm por 10 minutos y descartar el etanol; inmediatamente se adicionan 500 µl de etanol al 70% para lavar el pellet y centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos; se descarta el sobrenadante rápidamente sin eliminar el pellet. Se deja secar a temperatura ambiente colocando el tubo invertido sobre una toalla de papel por 15 minutos, y finalmente se resuspende en 50 µl de agua destilada estéril.

5.5 Determinación de la cantidad, pureza y calidad del DNA

La cantidad de DNA extraído se determinó espectrofotométricamente utilizando el equipo *Thermo Scientific NanoDrop™*. colocando 2µl de la muestra de DNA extraído en el lector óptico del equipo en una absorbancia de 260 a 280nm (Volkman *et al.*, 2006). Para determinar la pureza se calculó la relación $A_{260/280}$, definiendo como pureza de DNA adecuada cuando la relación se encuentra entre 1.8 y 2.0. (Thakuria *et al.*, 2008)

Paralelamente se realizó la verificación de la calidad del DNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%^(p/v) en TBE 1X (0.09M de Tris-base, 0.09 de borato de sodio y 2.4 mM de EDTA, pH 8.3) a 80V por 1 hora, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5µg/ml) por 15 min y se lavó con agua destilada por 5 min. (Aquilanti *et al.*, 2004). El DNA fue visualizado en un equipo Gel Documentation de Biorad® y el tamaño del ADN de alto peso molecular fue determinado por comparación visual con un marcador de peso molecular de 1kb (Bioline®). Finalmente, la imagen se capturó y analizó con el Software Quantity One 1-D Analysis (Biorad®).

5.6 Amplificación del gen funcional *nifH*

La amplificación del gen funcional *nifH* se llevó a cabo utilizando los primers degenerados For A y Rev (GCIWTITAYGGNAARGGNGG y GCRTAIABNGCCATCATYTC, respectivamente) Bürgmann (2004) que amplifican una región de 464 pb desde la posición 19 hasta la 482. El volumen final utilizado fue de 25 µl compuesto por 1X de Buffer, 1,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1µM de primer For A, 1µM de primer Rev y 1 U Taq Polimerasa.

La PCR se inicia con la denaturación del DNA exponiéndolo a 95°C por 5 minutos, posteriormente se someterá a 30 ciclos con un paso de denaturación a 94°C por 1 minuto, un paso de hibridación a 50°C por 1 minuto, un paso de elongación a 72°C por 1 minuto y finalmente una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para este procedimiento se utilizó un termociclador (My cyclor de Biorad®).

Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1% TBE 1X visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta y las imágenes de los geles se almacenaron y analizaron en el Software Quantity One 1-D Analysis (Biorad®).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias fijadoras de nitrógeno

Se evaluó la morfología de las colonias crecidas en agar Ashby manitol, observándose colonias traslúcidas, lisas, regulares, tanto pequeñas (C2BR, C3BR, C2E, C5BR) como medianas (C5CA); igualmente se observaron colonias medianas, color crema, irregulares y brillantes.

Luego de realizar una observación microscópica de las células de cada aislamiento se encontraron bacilos Gram negativos tanto grandes como pequeños, y en algunos cultivos se observó la formación de quistes, característicos del género *Azotobacter*.

6.2 Caracterización fisiológica de los aislamientos

6.2.1 Cuantificación de la producción de AIA de cada aislamiento

La cuantificación de la producción de compuestos indólicos para cada uno de los aislamientos se realizó por triplicado, utilizando el Test de Salkowsky modificado por Celis y Gallardo (2008). Estos resultados se presentan en la tabla 1. Se observó que al adicionar el reactivo de Salkowsky al extracto crudo de cada uno de los aislamientos, se producía una coloración cuya intensidad fue proporcional a la concentración de compuestos indólicos presentes en las muestras.

Tabla 1. Cuantificación de la producción de AIA de cada aislamiento

CEPA	µg/ml	CEPA	µg/ml	CEPA	µg/ml
ATCC	51,7	C4T	33,8	C4CO	6,2
C1E	38,9	C5T	4,0	C5CO	5,7
C2E	11,7	C1BR	4,3	C1CA	40,0
C3E	4,7	C2BR	4,4	C3CA	4,2
C4E	38,5	C3BR	3,2	C4CA	5,3
C5E	3,4	C4BR	5,3	C5CA	10,1
C1T	3,1	C5BR	7,6	C1Z	4,4
C2T	3,7	CT	1,5	C2Z	3,7
C3T	3,2	C1CO	3,9		

◆ Aislamientos pertenecientes al grupo I del cladograma elaborado anteriormente por Jiménez (2007) a partir del análisis ARDRA con las enzimas *AluI*, *HpaII* y *RsaI*. (**Anexo 7**)

◆ Aislamientos pertenecientes al grupo II del cladograma elaborado anteriormente a partir del análisis ARDRA con las enzimas *AluI*, *HpaII* y *RsaI*. (**Anexo 7**)

◆ Aislamientos pertenecientes al grupo III del cladograma elaborado a partir del análisis de agrupamiento ARDRA con las enzimas *AluI*, *HpaII* y *RsaI*. (**Anexo 7**)

6.2.2 Extracción de DNA

Luego de realizar el protocolo de extracción utilizado por Jiménez (2007), se logró extraer DNA de las 25 cepas. Sin embargo, la cantidad de ADN obtenida fue variable y en algunos casos fue tan poca que no pudo ser visualizada mediante electroforesis (Figura 1). El hecho de no observar una banda de alto peso molecular en el gel de agarosa no significa que esta muestra no pueda ser utilizada en los ensayos de amplificación del gen *nifH*. Se encuentra documentado (White, 1993) que a partir de cantidades pequeñas de DNA (< 10 ng/μl) se puede lograr la amplificación de genes que se encuentren en más de una copia en el genoma bacteriano:



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA de 9 cepas fijadoras de nitrógeno. 1) C1T, 2) C1T, 3) C2T, 4) C2T, 5) C3T, 6) C4T, 7) C5T, 8) CT, 9) C1E, 10) C2E, 11) C3E, 12) C5E, 13) C1CA, 14) C4CA, 15) C5CA, 16) C1BR, 17) C2BR, 18) C3BR, 19) C4BR, 20) C5BR, 21) C1Z, 22) C2Z, 23) C1CO, 24) ATCC Fuente: Autor...

6.3 Amplificación del gen funcional *nifH*

Para la amplificación del gen *nifH* se realizaron ensayos preliminares utilizando los primers degenerados forA y rev reportados por Bürgmann (2004). Los resultados obtenidos, mostraron una o dos bandas de amplificación en nueve de las 25 muestras analizadas (ATCC, C2E, C1T, C5E, C3BR, C5CA., C1CA, C3E y C4T) (Figura 2).



Figura 2. Amplificación del gen funcional *nifH* en 9 aislamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno. 1) MPM(100pb) 2) ATCC, 3) C2E, 4) C4T, 5) C1CA, 6) C3E, 7) C1T,8) C5E, 9) C3BR, 10) C5CA y 11) agua estéril. Fuente: Autor

Con el fin de determinar la cantidad de DNA adecuada para obtener una buena amplificación se hicieron diluciones 1/20 para las muestras de DNA mas concentradas \pm 680 ng/ μ l (ATCC, C2E, C1T, C5E, C3BR y C5CA), diluciones 1/10 para las muestras de DNA con concentración media \pm 235 ng/ μ l (CICA y C3E), y se tomaron 2 μ l directamente de la muestra C4T que fue en la que menor cantidad de ADN se obtuvo. \pm 9.5 ng/ μ l De cada una de las muestras diluidas se tomaron 4 μ l para realizar la amplificación.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el sector agrícola la ausencia de nitrógeno en forma asimilable para las plantas representa un factor limitante para el crecimiento de cultivos debido a que estos compuestos son relevantes para la síntesis de moléculas fundamentales como los ácidos nucleicos y las proteínas, al mismo tiempo las plantas no tienen la maquinaria metabólica para romper el triple enlace del nitrógeno molecular e integrarlo a su sistema. Sin embargo, la fijación de nitrógeno es un proceso que puede ser realizado por ciertos microorganismos *Procariontas* pertenecientes al dominio *Bacteria* y metanogénicas del dominio *Archaea*, de los cuales los más utilizados para la agricultura son los microorganismos del dominio *Bacteria* (Hurek y reinhold, 2005; Klipp *et al.*, 2005; Mantilla *et al.*, 2007 y Franche *et al.*, 2009).

Las bacterias diazótrofes (fijadoras de nitrógeno) son consideradas como PGPR ya que al metabolizar el nitrógeno molecular y transformarlo a una forma asimilable puede ser utilizado por la planta, adicionalmente, estas bacterias se encuentran en la rizósfera en donde interaccionan con otros microorganismos, y al mismo tiempo producen metabolitos que pueden ser benéficos para el crecimiento de la planta como fitohormonas del tipo auxinas y giberelinas, así como antibióticos que inhiban el crecimiento de organismos patógenos (Kloepper, 2009)

Dentro de las bacterias diazótrofes, *Azotobacter spp.*, ha sido ampliamente estudiado debido a su importancia a nivel agrícola como fijador de nitrógeno y su capacidad para producir ácido Indol acético (AIA), que se encuentra implicado en los procesos de elongación celular. En este trabajo se logró determinar la producción de AIA a mediante el test de Salkowsky después de 4 días de fermentación discontinua. Los resultados mostraron que la cepa que mayor concentración de AIA produjo (51,7 µg/ml) fue la cepa control *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518 (Tabla 1), varios autores han reportado la eficiente producción de compuestos indólicos por *A. vinelandii* (Califa y González, 2009; Celis y Gallardo, 2008; Torres *et al.*, 2000; Lee *et al.* 1970). Mantilla (2008), trabajando con la misma cepa obtuvo concentraciones de 1,54 ppm y 3,48 ppm a las 48 y 72 h respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, en ese trabajo aunque se utilizó el mismo reactivo de Salkowsky, se emplearon proporciones diferentes respecto al extracto crudo y sobrenadante y la cuantificación se realizó a partir de cultivos en los medios semisólidos Ashby y Burk's. Sergeeva, 2007 afirma que la producción de compuestos indólicos depende tanto de la especie como de la cepa, así como de las condiciones de cultivo incluyendo la

presencia de triptófano, las condiciones de pH, nivel de oxígeno y fase de crecimiento. Además, en los tiempos evaluados por Mantilla (2008) (48 y 72) posiblemente todavía no se alcanza la mayor producción de AIA, mientras que Califa y Gonzales (2009) afirman que la producción de AIA se incrementa después del tercer día de fermentación.

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) existen diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre las cepas evaluadas respecto a la concentración de AIA, siendo *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518 la cepa de mayor producción y las cepas C3BR, C3T, C5E, C1T, C2T, C2Z, CICO, C5T, C3CA, CIBR, C5CO, C3E, C4CO, C4CA, CIZ, C4BR, C2BR, C5BR, C5CA y C2E las que menor cantidad produjeron (Anexo 6).

La producción de AIA osciló entre 1,5 $\mu\text{g/ml}$ y 51,7 $\mu\text{g/ml}$. En orden descendente, los aislamientos que mayor cantidad de AIA produjeron fueron C1CA (40 $\mu\text{g/ml}$), C1E (38,9 $\mu\text{g/ml}$), C4E (38,5 $\mu\text{g/ml}$) y C4T (33,8 $\mu\text{g/ml}$). Estos aislamientos coinciden con los aislamientos ubicados en el grupo I del ARDRA de acuerdo con los resultados presentados por Jiménez (2007) (Anexo 7) quien realizó un análisis de agrupamiento de aislamientos de bacterias diazótroficas con base en los patrones de restricción del DNA ribosomal 16S fueron identificados como *A. vinelandii*.

En la investigación de Jimenez (2007) en el primer grupo se ubicaron las cepas que mostraron un patrón ARDRA similar al generado por *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518, en el grupo II se identificaron las cepas C5CO presuntivamente *A. nigricans*, por otro lado, C5BR no presentó bandas similares con el género *Azotobacter* pero sí con *Burkholderia derxi* y *Azospirillum sp.* Finalmente, en el tercer grupo se observó que la cepa C5T y C5E pertenecen a *A. chroococcum* y la cepa C1Z presuntivamente es identificada como *A. paspali*.

De acuerdo con esta información, se observó que los aislamientos identificados como *Azotobacter vinelandii* del grupo I corresponden con las cepas que produjeron la mayor cantidad de AIA (Tabla 1); por tanto, la caracterización fisiológica realizada soporta los resultados obtenidos previamente por Jiménez (2007). En el caso de la cepa C5T que fue previamente identificada como *A. chroococcum* no se obtuvo, como se esperaba, una concentración alta de AIA. Sin embargo, este microorganismo ha sido ampliamente utilizado para la producción de bioinoculantes por su capacidad de producir altas concentraciones de fitohormonas. Como se mencionó anteriormente, la cantidad de fitohormona producida puede variar de acuerdo a las condiciones en las que se desarrolle el estudio (Sergeeva, 2007)

De forma paralela, para lograr una identificación de las cepas fijadoras de nitrógeno más detallada, se evaluó la presencia de genes funcionales *nifH*, ya que se conoce que el complejo nitrogenasa contiene secuencias conservadas evolutivamente y por ende han sido objeto de análisis filogenéticos así como de diversidad funcional (Raymond *et al.*, 2004; Zerh *et al.*, 2003; Zhou, 2003)

Con el fin de confirmar la presencia del gen *nifH* en 9 de las 25 cepas estudiadas, se realizó la amplificación del gen con un “set de primers” degenerados, que produjo más de una banda en algunas cepas (figura 2), esto posiblemente se debe a que los “primers” degenerados pueden hibridar en diferentes blancos del operon para permitir la amplificación de secuencias relacionadas. De acuerdo con Cortázar y Silva (2004) “primers” degenerados pueden ser utilizados para amplificar secuencias conservadas de un gen o de genes relacionados de un genoma de un organismo. Las cepas ATCC, C5CA, C2E, C4T, C3E y C1T presentan bandas de amplificación, lo cual indica que pueden tener presente el gen *nifH* pero los primers, al ser degenerados pueden unirse a otras secuencias similares dentro del mismo operon *nifHDK* y amplificarlas. Marusina *et al.* (2001) plantearon que la amplia diversidad filogenética de microorganismos fijadores de nitrógeno puede llegar presentar mayor cantidad de secuencias variables que secuencias conservadas como algunas que se encuentran en el gen *nifH*, por lo que la construcción de primers con nucleótidos específicos es limitada.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización fisiológica y molecular de los aislamientos pueden ser utilizados como apoyo para lograr una identificación más acertada de estas cepas, sin embargo, no son determinantes para considerar que son o no promotoras de crecimiento vegetal. Debido a esto se hace necesario realizar estudios en campo para evaluar su comportamiento, así como pruebas de reducción del acetileno (ARA) entre otras.

8. CONCLUSIONES

Se caracterizaron fisiológicamente las cepas fijadoras de nitrógeno a partir de la cuantificación de la producción de AIA, determinado que los aislamientos C1CA, C1E, C4E y C4T producen mayores concentraciones de este compuesto.

Se pudo confirmar mediante la evaluación de la producción de AIA que las cepas CICA, CIE, Y C4T pertenecientes al grupo I del ARDRA corresponden a bacterias de la especie *A. vinelandii*.

Se logró identificar la presencia del gen *nifH* en los aislamientos ATCC, C2E, C1T, C5E, C3BR, C5CA., CICA, C3E y C4T

Los resultados obtenidos en este trabajo ayudaron a la caracterización de algunos aislamientos de *Azotobacter* obtenidos preliminarmente de cultivos hortícolas colombianos.

9. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos de amplificación con las 9 cepas que se obtuvo amplificación, utilizando una PCR de gradiente o un touch down pcr.

Realizar alineamientos de secuencias de gen *nifH* reportadas para el género *Azotobacter* en la base de datos con el fin de diseñar "primers" específicos para el género

Realizar la secuenciación de los productos de PCR obtenidos basados en la identificación del gen *nifH* para su análisis con herramientas bioinformáticas.

Realizar ensayos de reducción de acetileno para cada una de las cepas

10. REFERENCIAS

ADESEMOYE A. KLOEPPER J. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. *Applied Microbiology and biotechnology*. Berlyn. Vol 85.

AQUILANTI. L, MANNAZZU. I, PAPA. R, CAVALCA. L, CLEMENTI. F. 2004. Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of *Azotobacteraceae*: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. Vol 57. Pp 197-206.

BÜRGMANN H.

CELIS L. GALLARDO I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Trabajo de Grado de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 49-59

COLE J. CHAI B. MARSH T. FARRIS R. WANG Q. KULAM S. 2003. The ribosomal Database Project (ROD-11): Previewing a new autoaligner that allows updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res*. Vol 31. Pp 442-443.

CORRALES E. 2003. Sostenibilidad Agropecuaria y Sistemas de Producción Campesinos. Congreso Nacional Agrario. Editorial ILSA. Pp 5-49

CORTAZAR A. SILVA E. 2004. Métodos físico-químicos en biotecnología PCR. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional de México.

FRANCHE C. LINDSTRÖM. ELMERICH C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. Vol 321. Pp 35-59

GLIESSMAN, S. 1990. Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture. Lewis Publishers. United States of America. Pp 9-16

GORDON S. WEBERT R. 1950. Colorimetric estimation of acid indoleacetic

HAMELIN J. FROMIN N. TARNAWSKI S. TEYSSIER S. ARAGNO M. 2002. *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rizosphere of *Monilinia coerulea*, an oligotrophic perennial grass. *Environmental Microbiology*. Vol 8. Pp 477-481

HENDRIK J. 2006. The Family Azotobacteraceae. *Prokaryotes*. Vol 6. Pp 759-783

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2006. Resolución N00375. Disposiciones sobre Registro y Control de Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia.

JACKSON R., BROWN M, BURLINGHAM K. 1964. Similar effects on tomato plants of *Azotobacter* inoculation and application of gibberellins. *Nature (London)* Vol 203. Pp 851–852.

JIMENEZ D. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter spp.* Mediante el análisis de restricción del DNArribosomal 16S. Trabajo de grado. Facultad de ciencias básicas. Pontificia Universidad Javeriana.

KLIPP W. MASEPOHL B. GALLON J. NEWTON W. 2005. Genetics and regulation of Nitrogen fixation in free- living bacteria. Kluwer Academic Publishers. USA.

LEI S PULAKAT L. SUH M. GAVINI N. 2000. Identification of a second site compensatory mutation in the Fe-protein that allows diazotrophic growth of *Azotobacter vinelandii* UW97. *FEBS*. Elsevier Science. Vol 478. Pp 192-196

MANTILLA C. VILLALBA M. OVIEDO L. 2007. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol 9. Pp 6-14

MARUSINA A. BOULYGINA E. KUZNETSOV B. TOUROVA T. KRAVCHENKO. GAL'CHENKO V. 2001. A system of oligonucleotide primers for the amplification of *nifH* Genes of different taxonomic groups of prokaryotes. *Microbiology*. Vol 70. Pp 73-78

NTC (Norma Técnica Colombiana) 1927. 2001. Fertilización y acondicionadores de suelos. Definiciones. Clasificación y Fuentes de Materias Primas.

PEÑA H. REYES I. 2007. Aislamiento y Evaluación de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Disolventes de fosfatos en la Promoción del Crecimiento de la Lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*. Vol 32. Pp 560-565.

PEQUEÑO P. 1969. *Agroquímica*. La Habana. Pp 25-35

POLY F. RANJARD L. NAZARET S. GOURBIÈRE, JOCTEUR L. 2001. Comparison of *nifH* Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 67. Pp 2255-2262

RAYMOND J. SIETFERT J. STAPLES C. BLANKENSHIP R. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution*. Vol 21. Pp 541-554

REES D. HOWARD J. 2000. [Nitrogenase: standing at the crossroads.](#) *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol 4 Issue 5, 1 Pp 559-566

RITTER A. MUÑOZ R. BOSH D. SCHAEFFER. POTTER. 2005. Evaluación Mediante Técnicas de Simulación Directa e Inversa del Cambio del flujo y Lixiviación del Suelo con un Cultivo de Cubierta de Verano en el Sur de Florida. *Estudios de la Zona no Saturada del Suelo*. Vol 7. Pp 281-287

RODICIO M. MENDOZA M. 2004. Identificación Bacteriana Mediante Secuenciación del ARNr 16s: Fundamento, Metodología y Aplicaciones en Microbiología Clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. Cap 11. Pp 81-87

RODRIGUEZ D. URREGO L. MARTINEZ P. BERNAL J. 2003. Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aislado de bosque alto andino cundinamarqués Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 28.

ROLDÁN T. ELEIA M. PÉREZ C. GARCÍA J. 1997. Incrementos de la Fijación Biológica del Nitrógeno Mediante la Inoculación Combinada de Bacterias Fijadoras de N₂ Atmosférico. Centro de Desarrollo Agrícola de las FAR, AGROFAR. Santo Domingo. Cuba.

RUIZ L. 2002. Análisis y orientaciones para el desarrollo de la agricultura sostenible en Colombia: Nuevas Tendencias de Mercados Agrícolas Mundiales. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas. Pontificia Universidad Javeriana.

RYU C. FARAG M. HU C. REDDY M. WEI H. PARE P. KLOEPPER J. 2003. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. Vol 100. Pp 4927-4932.

RYU C. FARAG M. HU C. REDDY M. KLOEPPER J. PARE P. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. Plant Physiology. Vol 134. Pp 1017-1026.

SCHMID M. HARTMAN A. 2007. Molecular Phylogeny and Ecology of Root Associated Diazotrophic α and β -Proteobacteria. Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Vol 5. Pp. 21-40.

SILGUY C. 1999. La agricultura biológica: Técnicas Eficaces y No Contaminantes. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. Pp 2-9

SKWIERINSKI R. JAIMES R. MUÑOZ A. 1995. Variaciones diarias y estacionales de actividad nitrogenasa y concentración de leghemoglobina y su relación con factores climáticos. Agronomía trop. Vol 54. Pp 171-188

SOMA P. MANNA A. AMMAL P. 1997. Induction of Encystment and Poly- β -hydroxybutiric Acid. Production by *Azotobacter chroococcum* MAL-201. Current Microbiology. Vol 35. Pp 327-330.

SUNDARA RAO, W. V. B., MANN, H. S., PAL, N. B., MATHUR, R. S. 1963. Bacterial inoculation experiments with special reference to *Azotobacter*. Indian Journal Agricultural Science 33:279-290.

TAPIA M. LARIOS A. TAPIA L. ANGUIANO J. VIDALES. 2007. Lixiviación de Nitratos en dos Sistemas de Manejo Nutricional y de Agua en Aguacate de Michoacan. Proceedings VI world avocado congress. Pp 1-8

THAKURIA, D. SCHMIDT, O., EGAN, D. & DOOHAN, F. 2008. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology & Biochemistry*. 40:6:1390-1403.

TORRES M. VALENCIA S. BERNAL J. MARTINEZ P. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* And *Pseudomonas sp.*, Producers of Indole 3-Acetic and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol 42. Pp 171-176

VOLKMANN H. SCHWARTZ T. KIRCHEN S. STOFER C. OBST U. 2006. Exvaluation of Inhibition and Cross-reaction Affects on Real Time PCR Applied to the Total DNA of Wastewater Samples for the Quantification of Bacterial Antibiotic Resistance Genes and Taxon-specific Targets. *Molecular and cellular Probes*. Vol 21. Pp 125-133.

YOUNG, J. 2005. The phylogeny and evolution of nitrogenases. *Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms*, Cap 14. Pp 221-241

ZEHR J. JENKINS B. SHORT S. STEWARD G. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross- system comparison. *Environmental Microbiology*. Vol 5. Pp 539-554.

ZHOU J. 2003. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion Microbiology*. Vol 6. Pp 288- 294

Refencias en línea

AZZIS G. CATALÁN A. CALLEJAS X. GILL P. CASTRO S. BATISTA S. 2007. Estudio Comparativo de los Filotipos *nifH* y 16S ARNr de una Comunidad de Cianobacterias en suelos de la isla Rey Jorge, Antártida Marítima. En: <http://www.dna.gov.ar/CIENCIA/SANTAR07/CD/PDF/CVCO343.PDF>. Consulta; 03 de Agosto de 2009.

FORNASERO L, M.A. TONIUTTI S.P. GAMBAUDOY H.A. MICHELOUD. 2009. Cátedra de Diagnóstico y Tecnología de Tierras, FCA, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Argentina. En: http://www.engormix.com/fertilizacion_biologica_bacterias_promotoras_s_articulos_1305_AG_R.htm. Consulta: 20 de julio de 2009.

HERNANDEZ T. GARCÍA C. PASCUAL J. HERNANDEZ M. El Uso de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Agricultura Ecológica: Una alternativa a la Fertilización inorgánica. En: http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Agri/Agri_2005_872_184_187.pdf. Consulta: 1 de agosto de 2009.

HUREK T. REINHOLD B. 2005. Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plants: hidden activities of unknown bacteria. Nitrogen fixation in agriculture, Forestry, Ecology and the Environment. Netherlands. 73-198.

LANZA G. ARENAS V. MEDINA M. 1984. La fijación de nitrógeno asociada a la descomposición de halofitas en una laguna litoral al noroeste de México. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. En: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1986-2/articulo234.html>. Consulta: 30 de julio de 2009.

LAÑEZ E. 2005. Microbiología general. Universidad de Granada. Facultad de ciencias. España. En: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/11nutrientes.htm>. Consulta: 20 de julio de 2009.

ANEXOS

ANEXO 1. Medio de cultivo Ashby

Componente	g/L
Manitol- Sacarosa- benzoato	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	0.2
CaCl ₂ .H ₂ O	0.2
KH ₂ PO ₄	1
Agar	15
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005

Fuente: Martinez, 2003

pH 7.0 ±2.

ANEXO 2. Composición de medio BT

Componente	g/L
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4
NH ₄ NO ₃	0.4
NaCl	0.2
Glucosa	5
Triptona	20

ANEXO 3. Composición de TE 1X

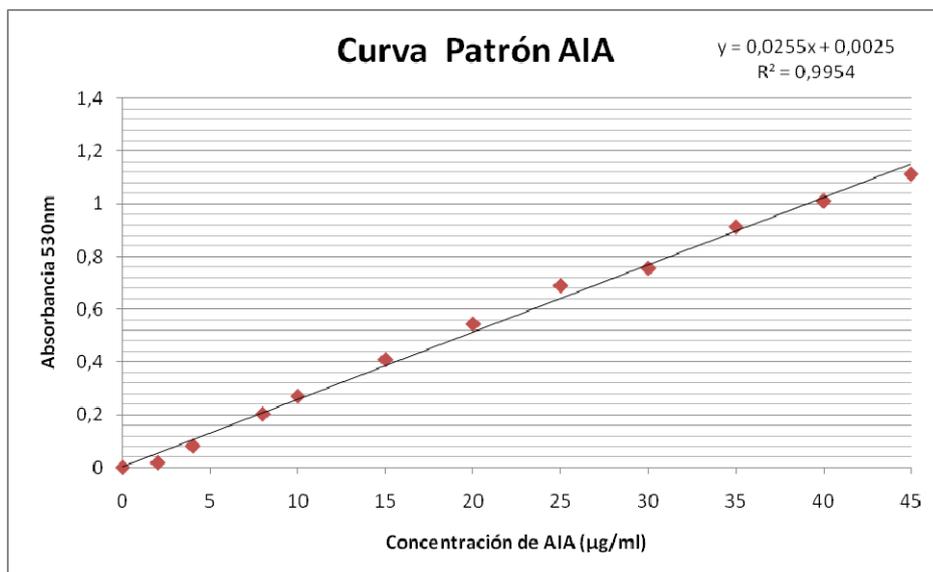
Componente	Cantidad por cada 100ml
EDTA 1mM	0.08ml
Tris 10mM	1ml
Agua destilada	39.52ml

ANEXO 4. Preparación de Fenol Cloroformo Isoamílico (FCI) (25:24:1)

Componente	Cantidad por cada 100ml
Fenol	50ml
Cloroformo	48ml
Alcohol Isoamílico	2ml

ANEXO 5. Curva patrón AIA

$\mu\text{g/ml}$	ABS
0	0
2	0,018
4	0,082
8	0,202
10	0,270
15	0,408
20	0,543
25	0,689
30	0,755
35	0,912
40	1,010
45	1,112



ANEXO 6. Análisis de varianza, agrupación de Duncan

AIA						
Agrupación de Duncan						
cepa	N	$\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
C3BR	9	,08344				
C3T	9	,08433				
C5E	9	,08811				
C1T	9	,08978				
C2T	9	,09622				
C2Z	9	,09644				
CICO	9	,10100				
C5T	9	,10378				
C3CA	9	,10989				
CIBR	9	,11100				
C5CO	9	,11589				
C3E	9	,12111				
C4CO	9	,13211				
C4CA	9	,13222				
CIZ	9	,13278				
C4BR	9	,13644				
C2BR	9	,19189				
C5BR	9	,19700				
C5CA	9	,19878				
C3E	9	,30033				
CT	9		,59744			
CICA	9		,68200	,68200		
C4T	9			,86422	,86422	
C4E	9				,98444	
C1E	9				,99456	
ATCC	9					1,20244
Sig.		,070	,375	,057	,199	1,000

ANEXO 7. Agrupamiento de los aislamientos obtenido a partir de un análisis de restricción del gen ribosomal 16S (Jiménez, 2007)

