

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE CEPAS NATIVAS
COLOMBIANAS DE *Azotobacter* sp, CON BASE EN LA CAPACIDAD
SOLUBILIZADORA DE FOSFATO Y PRESENCIA DE GENES *nifH***



Juan Felipe Mateus Maldonado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.

2016

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTIZANTE DE CEPAS NATIVAS
COLOMBIANAS DE *Azotobacter* spp, CON BASE EN LA CAPACIDAD
SOLUBILIZACION DE FOSFATO Y PRESENCIA DE GENES *nifH*.**

Juan Felipe Mateus Maldonado

José Salvador Montaña. PhD
Director

María Ximena Rodríguez Bocanegra PhD
Evaluador

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.

2016

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

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

Resumen

El nitrógeno y el fósforo son los dos elementos más importantes y limitantes del crecimiento vegetal en la agricultura, en la actualidad la forma por cual se suplen estas deficiencias de macronutrientes en los suelos es por medio de la utilización de fertilizantes de base química, los cuales son fácilmente asimilables por las plantas. Investigaciones recientes han demostrado que la mala utilización de estos productos está generando altos niveles de contaminación ambiental, contribuyendo directamente a la eutrofización de cuerpos de agua y al aumento de gases efecto invernadero en la atmósfera. Aunque se conocen los problemas ambientales ocasionados por los fertilizantes de base química, su uso ha aumentado en países del tercer mundo en más del 400% en los últimos 30 años, este crecimiento en el uso de fertilizantes en la agricultura se estima seguirá en aumento por la erosión de suelos cultivables y una población mundial cada vez mayor.

Una de las alternativas propuestas para mitigar el impacto ambiental generado por los fertilizantes químicos ha sido la producción y utilización de biofertilizantes, los cuales tienen la capacidad de controlar la liberación de formas solubles de nitrógeno y fósforo en el suelo, que podrían evitar la acumulación excesiva de nitrato (NO_3^-) amonio (NH_4^+) y fosfatos (PO_4), que se pierden por procesos de lixiviación escorrentía y volatilización. Dentro de los agentes biológicos propuestos para la producción de biofertilizantes se encuentra bacterias del género *Azotobacter* las cuales, por un lado, tiene la capacidad de fijar nitrógeno molecular (N_2) por medio del complejo nitrogenasa, generando amonio (NH_4^+) que es asimilable por las plantas y por otro lado, son capaces de solubilizar fosfato inorgánico del suelo por medio de la producción ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas. *Azotobacter* sp. también está reportado como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) gracias a la capacidad de producir ácido indol acético.

En este trabajo se determinó la presencia del gen *nifH*, que codifica la enzima nitrogenasa reductasa en cepas de *Azotobacter* aisladas de cultivos hortícolas. Por otra parte, se evaluó la capacidad fosfato solubilizadora de estos aislamientos en caldo NBRIP, mediante la cuantificación de fósforo soluble. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, sumado a la producción de ácido indol acético (AIA), por parte de estos aislamientos, evaluada en trabajos previos, se concluyó que los aislamientos C3E y C5E son los que tienen un mayor potencial para ser utilizadas como biofertilizantes.

Introducción

El nitrógeno y el fósforo son elementos fundamentales para el buen desarrollo y crecimiento vegetal. Estos elementos se encuentran en el suelo en formas orgánicas, inorgánicas, solubles o insolubles. Dependiendo del estado en el que se encuentren, pueden o no ser utilizados por las plantas (Abdel, *et al* 2014). La agricultura masiva, los monocultivos y la falta de rotación de los mismos, ha provocado una disminución del nitrógeno y fósforo en los suelos, afectando la producción agrícola alrededor del mundo (Acevedo *et al.*, 2013).

Como una estrategia para afrontar el problema de la baja producción de los cultivos de importancia económica, en 1913 se desarrolló el primer método industrial de fijación de nitrógeno conocido como HABER-BOSCH, por el cual se transforma el N_2 (nitrógeno molecular) a NH_4^+ (amonio) que es asimilable por las plantas. El método requiere de un alto consumo de energía, gas natural e hidrocarburos para generar una temperatura de $750^\circ K$ y una presión de 350 atm. Bajo estas condiciones se inestabiliza la configuración electrónica del N_2 lo que permite el rompimiento del triple enlace entre sus moléculas, posibilitando la unión de moléculas de H. El método HABER-BOSCH es utilizado hoy en día para producir el 70% de los agroquímicos a nivel mundial, generando actualmente más de 300 millones de toneladas métricas de CO_2 (Cherkasov *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso inadecuado de fertilizantes químicos está generando una sobreacumulación de nitrógeno y fósforo en el suelo, los cuales por procesos de escorrentía, lixiviación y volatilización contaminan fuentes hídricas de agua y generan gases efecto invernadero (Aquilanti, *et al.*, 2004)

Estos problemas ambientales son especialmente visibles en países con vocación agrícola, pero con bajos recursos económicos. En China e India, por ejemplo, el 57% del nitrógeno y el 69% del fósforo que contamina sus fuentes hídricas, proviene del uso de agroquímicos (Smith y Siciliano, 2015). En el caso de Suramérica, Colombia es el segundo país con mayor uso de fertilizantes químicos. Se calcula que en el 2010 se utilizaron 1,5 millones de toneladas comparado con las 20000 toneladas que se emplearon en 1980. Esta cifra muestra el uso indiscriminado de fertilizantes químicos en los últimos 30 años (Delgadillo y Garcia, 2015).

Como consecuencia del uso excesivo e inadecuado de agroquímicos, en la actualidad se están buscando alternativas para disminuir la fabricación y posterior uso de fertilizantes, dentro de las soluciones aparecen los biofertilizantes, los cuales contienen altas concentraciones de microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, productores de auxinas y productores de metabolitos antigúnicos (Bashan *et al.*, 2014).

Dentro de los microorganismos más estudiados con potencial biofertilizante se encuentra el género *Azotobacter*. Este género ha sido utilizado como biofertilizantes por presentar altas tasas de fijación de nitrógeno, un amplio rango de actividad antagónica contra fitopatógenos (Bhatti *et al*, 2010), su habilidad para producir exopolisacáridos, sideróforos, vitaminas y promotores de crecimiento vegetal como AIA y giberelinas (Bellenger *et al*, 2013). Estudios realizados en cultivos de chili en India demostraron que biofertilizantes producidos a partir de *Azotobacter vinelandii* redujeron en un 50% la utilización de agroquímicos, lo cual justifica el uso de cepas del género *Azotobacter* para la formulación de biofertilizantes de suelo (Thilagar *et al*, 2015).

La Unidad de Investigaciones Agropecuarias UNIDIA en los últimos años ha trabajado en la búsqueda de cepas nativas de *Azotobacter* que puedan ser empleadas como biofertilizantes en cultivos hortícolas. Para tal fin se ha logrado caracterizar aislamientos nativos con base en el crecimiento en medios libres de nitrógeno, las características macro y microscópicas, el análisis de restricción del rDNA 16S y recientemente la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (AIA).

Con base en lo anterior, y con el ánimo de ampliar el conocimiento sobre las capacidades metabólicas de los aislamientos de *Azotobacter*, el objetivo de este trabajo consistió en determinar el potencial biofertilizante de aislamientos colombianos de *Azotobacter* en función de la capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato.

1. Planteamiento del problema de investigación y justificación

La pérdida de fertilidad del suelo es una de las mayores preocupaciones en este momento y una prioridad de los gobiernos alrededor del mundo para otorgar seguridad alimentaria. Esta pérdida de fertilidad es producto de cambios climáticos, sociales y ambientales, pero uno de los más graves es producto del mal manejo de suelos, al no tener rotaciones de cultivos y el uso inapropiado de agroquímicos que causan descenso en la diversidad microbiana nativa, cambios en las características físico-químicas del suelo, contaminación de fuentes hídricas por procesos de escorrentía y lixiviación de los fertilizantes nitrogenados y fosfatados y acumulación de NO₂ (Orozco *et al*, 2009)

La pérdida de fertilidad de los suelos motivó el desarrollo y perfeccionamiento de la producción de biofertilizantes con el fin reducir los problemas ambientales asociados al uso indiscriminado de fertilizantes de base química (Coskun *et al*, 2016). Los biofertilizantes son preparaciones de células vivas o latentes capaces de cumplir una o varias acciones benéficas tanto en el suelo como en las plantas, al favorecer la fijación biológica del nitrógeno, solubilización del fósforo, producción de reguladores de crecimiento vegetal, producción de antibióticos, resistencia a pesticidas y generación de agentes quelantes del hierro, entre otras (Kantachote *et al*, 2016). Para emplear un biofertilizante, se tiene que tener en cuenta la comunidad microbiana nativa, ya que esta posee características que le favorecen la adaptación al nuevo habitat a colonizar, por lo cual es fundamental que se desarrollen técnicas de aislamiento y caracterización de microorganismos nativos que tengan potencial para ser usados como biofertilizantes (Abdel *et al*, 2014).

En este trabajo se pretende determinar el potencial biofertilizante de aislamientos colombianos de *Azotobacter* spp., en función de la capacidad de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, teniendo en cuenta, además, los resultados obtenidos en trabajos previos, sobre la producción de AIA.

2. Marco teórico

2.1 Importancia del nitrógeno en la agricultura

El nitrógeno es uno de los macroelementos más importantes para el desarrollo y crecimiento vegetal, este elemento es necesario en las plantas para la síntesis de ácidos nucleicos, enzimas, proteínas y clorofila (Dermeñaki *et al*, 2012). Se estima que el 78% del aire corresponde a nitrógeno molecular, sin embargo, esta forma gaseosa no es asimilable por las plantas. Para solucionar el problema y aumentar la productividad de los cultivos se desarrollaron fertilizantes químicos que liberan nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3) que son asimilables por las plantas (Franchi *et al*, 2013). Sin embargo el uso inadecuado de los agroquímicos nitrogenados y fosfatados está ocasionando altos niveles de contaminación ambiental, eutrofizando fuentes de agua, generando gases efecto invernadero e intoxicando el suelo por acumulación de (NO_2) (Gupta *et al*, 2012). El uso y dependencia de agroquímicos en la agricultura está en constante crecimiento desde 1913, debido a factores demográficos, ambientales y socioeconómicos. Existen casos específicos como China, India, Brasil y Colombia

en donde se usan más de 499 kg ha^{-1} de fertilizantes, esto es 5,8 veces el promedio mundial de uso de agroquímicos por hectárea (Smith y Siciliano, 2015). Este exceso de fertilizantes es el responsable del 57% del nitrógeno y el 69% del fósforo contaminante en ríos y lagos de china. En Colombia los estudios realizados por Delgadillo y colaboradores en 2015 en cultivos de caña de azúcar, muestran el cambio en las entradas y salidas de nitrógeno en suelo en los últimos 60 años (Figura 1).

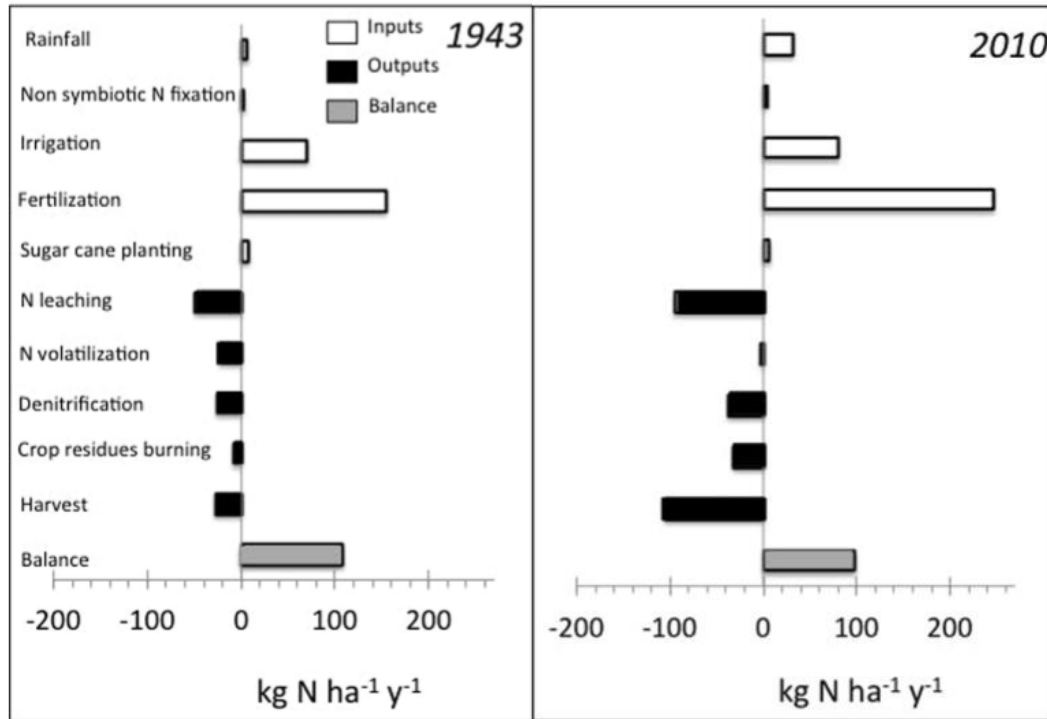


Fig1. Balance de nitrógeno en caña de azúcar 1943-2010. Cantidades anuales de N (Kg N ha^{-1}): entradas (blanco), salidas (negro) y balance total en (gris). (Delgadillo *et al*, 2015)

Como se observa en la figura1, la volatilización junto con lixiviación son las mayores salidas del nitrógeno provenientes en su mayoría de la fertilización, riego y lluvia.

Para tratar de frenar el uso indiscriminado de fertilizantes se ha propuesto el uso de biofertilizantes, los cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno molecular, solubilizar fósforo y producir auxinas y giberelinas (Irian *et al*, 2014). Dentro de los géneros bacterianos más utilizados para el desarrollo de biofertilizantes se encuentran organismos diazotrofos de vida libre pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Azococcus* y *Azotobacter*. (Wani *et al*, 2013). Aunque la mayoría de la fijación natural de nitrógeno es realizada por microorganismos diazotrofos

simbiontes, el uso de bacterias diazótrofes de vida libre como biofertilizantes se justifica por varios motivos, 1) Estos microorganismos reducen el número de agentes microbianos utilizados para crear biofertilizantes, ya que un solo género puede llegar a tener más de una característica promotora del crecimiento vegetal (Jing y Qingye, 2011). 2) Se han reportado organismos del filo *Cyanobacteria* capaces de inocular suelos que sufren de inundaciones frecuentes, alta osmolaridad, alta temperatura y alta erosión (Jing y Qingye, 2011). 3) Géneros como *Azospirillum* y *Azotobacter* han demostrado ser resistentes al uso de plaguicidas (Kennedy, 2004). 4) *Azotobacter* ha aumentado la productividad en un 30% en cultivos de arroz, cebada y algodón, atribuido a la producción de sideróforos, compuestos antifúngicos, reguladores de crecimiento, solubilización de fosfatos y fijación biológica de nitrógeno (BFN) (Wakelin *et al*, 2010).

2.2 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los componentes esenciales para la vida de todos los organismos al formar parte de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kizilkaya, 2008). Los animales adquieren el nitrógeno consumiendo compuestos orgánicos, mientras que las plantas y microorganismos pueden sintetizar la mayoría de sus aminoácidos de compuestos orgánicos e inorgánicos.

Actualmente hay 4 mecanismos para fijar nitrógeno molecular, proceso HABER-BOSCH, fijación de nitrógeno inducido por plasma, fijación biológica de nitrógeno y fijación de nitrógeno por metalocomplex (Cherkasov *et al*, 2015). De estos cuatro mecanismos los dos más utilizados son el proceso HABER-BOSCH y la fijación biológica de nitrógeno.

Por el proceso HABER-BOSCH se produce el 70% de los fertilizantes en el mundo, siendo uno de los procesos industriales más costosos y contaminantes, al consumir el 2% de producción mundial de gas natural y el 1% de energía, otro punto negativo es que durante su funcionamiento se producen más de 300 mil toneladas de CO₂ al año (Cherkasov *et al*, 2015).

La fijación biológica del nitrógeno es el paso de N₂ atmosférico no asimilable por las plantas a NH₄⁺ en suelos. Esta reacción de reducción es llevada a cabo por microorganismos diazótrofes como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azospirillum*, *Azocarus* y *Azotobacter* (Nüsslein *et al*, 2015) los cuales pueden catalizar la reacción por tener el complejo enzimático nitrogenasa, el cual se compone de la proteína Fe (dinitrogenasa) y la proteína Mo-Fe (dinitrogenasa), teniendo en el centro activo metales catiónicos como molibdeno, vanadio o hierro, Estas subunidades son

codificadas por los genes *nif*, siendo el gen *nifH*, que codifica por la nitrogenasa reductasa, el gen marcador para la filogenia y diversidad de microorganismos diazotrofos por ser conservado evolutivamente (Levy-Booth *et al*, 2014). Aunque la presencia del gen *nifH* es ubicua en los microorganismos diazotrofos su expresión se encuentra ligada al tipo de suelo en donde habitan (Coelho *et al*, 2009).

La actividad enzimática de la nitrogenasa se ve influenciada por el metal catiónico que se encuentre en su centro activo, esto quedó evidenciado en los trabajos de (Orozco y Martinez, 2009) donde la productividad fue de 70% con molibdeno, 40% vanadio y 25% hierro.

Esto ayuda a explicar por qué el gasto energético es mayor en la fijación biológica de nitrógeno (0,32-0,74 Mj mol⁻¹ NH₄⁺) en comparación al método HABER-BOSCH (0,48 Mj mol⁻¹ NH₄⁺) (Cherkasov *et al*, 2015).

Los microorganismos encargados de la fijación biológica del nitrógeno pueden ser divididos según la relación que establezcan en el suelo y con la planta, de esta manera encontramos a *Rhizobium*. que solo es capaz de realizar la fijación al estar en simbiosis con plantas leguminosas, formando nódulos que protegen la enzima nitrogenasa de las tensiones de oxígeno, por la presencia de leghemoglobina la cual es una enzima con centro catalítico de hierro el cual secuestra el O₂ (Wasmund *et al*, 2015). *Azotobacter*, por otro lado, es una bacteria de vida libre fijadora de nitrógeno, por lo cual puede controlar la exposición de su nitrogenasa al oxígeno mediante tasas aceleradas de respiración entre otros mecanismos, esto le permite crecer en condiciones de aerobiosis y en medios sin fuente de nitrógeno (Wani *et al*, 2013).

Hoy en día existen dos técnicas para cuantificar la fijación natural de nitrógeno, 1) gas de ¹⁵N₂ y 2) “acetylene reduction assay” (ARA) o prueba de reducción de acetileno. La primera técnica consiste en cuantificar el paso de nitrógeno molecular marcado 15 a nitrógeno marcado 14. Esta reducción es producto de la transformación del N₂ a NH₄⁻ por el complejo nitrogenasa, esta técnica es muy precisa, pero se requiere de equipos y material especializado para realizarla. La otra técnica conocida como ARA, se realiza modificando la atmósfera de los cultivos con 0,2% de gas de acetileno (C₂H₂) el cual gracias al complejo nitrogenasa, se reduce formando gas de etileno (C₂H₄). La cantidad de gas producido se registra en un cromatógrafo de gases, esta técnica sobreestima el rendimiento del complejo nitrogenasa pero es más sencilla y económica de realizar (Bellenger *et al*, 2013).

2.3 Importancia del fósforo en la agricultura

El fósforo es uno de los macroelementos más importantes para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos, ya que hace parte de macromoléculas como los ácidos nucleicos y fosfolípidos, membranas celulares y participa en casi todas las rutas metabólicas, haciendo parte de moléculas altamente energéticas como el ATP (Wang *et al*, 2015).

La mayor cantidad de fosfato en el mundo se encuentra en forma de roca mineral conocida como apatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$ la cual puede recibir diferentes nombres según el radical unido hidroxiapatita (OH), fluorapatita (F) y cloroapatita (Cl). El fósforo mineral también se puede encontrar asociado a óxidos hidratados de Fe, Al y Mn, los cuales son poco solubles y asimilables por plantas y microorganismos. En la actualidad el 90% de la explotación minera de apatita, se utiliza para el desarrollo de fertilizantes y el otro 10% es utilizado en la industria de alimentos y química (Rodríguez y Fraga, 1999).

La segunda fuente de fósforo en el suelo es materia orgánica, la cual constituye el 30-50% del fósforo total en el suelo. El fósforo orgánico se encuentra principalmente en forma de fosfomonoésteres, fosfodiéster, fosfotriéster, ácidos nucleicos e inositol el cual es sintetizado por microorganismo y plantas y es la forma más estable de fósforo orgánico que se puede encontrar en el suelo (Sylvia *et al*, 2005 Rodríguez y Fraga, 1999).

La mayoría de suelos cultivables contienen grandes reservas de fósforo, la mayoría de estas reservas son provenientes de la utilización de fertilizantes fosfatados, los cuales se acumulan por procesos de fijación y precipitación al unirse a óxidos de metales antes de poder ser utilizados por plantas y microorganismos. Estos últimos juegan un papel fundamental en el ciclo del fósforo, el cual se basa en la oxidación y reducción de compuestos fosfatados, donde se producen reacciones de transferencia de electrones de fosfina (-3) a fosfato (+5) (Acevedo *et al*, 2013).

2.4 Solubilización de fósforo

El fósforo es un elemento limitante en el crecimiento de plantas debido a que se presenta generalmente de manera no soluble, al encontrarse en rocas fosfatadas (Bobadilla y Rincón, 2008).

La capacidad de permanecer soluble depende principalmente del pH del suelo, a pH por debajo de 6.0, se favorece la formación de fosfatos de hierro, aluminio y magnesio, mientras que, en suelos alcalinos, se favorece la formación de fosfatos de calcio. *Azotobacter* junto con otros géneros de bacterias, hongos y levaduras, han sido reportados por tener la capacidad de solubilizar las rocas fosfatadas del suelo por gran variedad de mecanismos como: la producción de ácidos orgánicos, oxidación-reducción, producción de sideróforos, reducción de fosfato férrico por producción de sulfuro de hidrógeno y producción de enzimas fosfatasas (Nosrati *et al*, 2013). Una de las formas por la cual se puede medir la cantidad de ortofosfatos (PO_4^{3-}), es por medio de la reacción azul de molibdeno (MB) la cual fue descrita por bezelius en 1826, esta reacción se compone de dos etapas, inicialmente, los iones de ortofosfato forman con los iones molibdato ácido molibdofosfórico, este último se reduce a azul de fosfomolibdeno (PMB) el cual se determina espectrofotométricamente. Para realizar la reducción de ácido molibdofosfórico a PMB se pueden utilizar dos agentes reductores, ácido ascórbico o dicloruro de estaño, dependiendo del agente reductor escogido la longitud de onda a la que se registra el PMB cambia de 900 a 700 nm (Edward *et al*, 2015).

2.5 Biofertilizantes

Según la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) un biofertilizante es “un fertilizante orgánico natural que ayuda a proporcionar a las plantas todos los nutrientes que necesitan y a mejorar la calidad del suelo creando un entorno microbiológico natural”, los biofertilizantes son productos que contienen uno o más microorganismos capaces de promover el crecimiento y desarrollo vegetal al igual que mejorar las propiedades químicas del suelo aumentando el nitrógeno total, fósforo soluble, potasio soluble, carbono orgánico, carbono orgánico disuelto, producción de catalasas, peroxidasas, polifenoloxidasas junto a la producción de auxinas, giberelinas e inhibición de patógenos (Saribay, 2003).

Actualmente ha sido imposible reemplazar los fertilizantes de base química por biofertilizantes pero si se ha logrado disminuir la cantidad agroquímicos usados en el campo. Estudios realizados por Vaneeckhaute y Meers en 2013, han demostrado que el uso de biofertilizantes en cultivos maíz, cebada, soya, palma y caña de azúcar han logrado disminuir en más del 50% la necesidad

de agroquímicos lo cual reduce la huella ambiental del campo en ecosistemas acuáticos, terrestres y atmosféricos.

3. Objetivos

3.1 General

Determinar el potencial biofertilizante de aislamientos colombianos de *Azotobacter* sp. en función de la solubilización de fosfato y presencia de genes *nifH*.

3.2 Específicos

- Evaluar la capacidad de solubilización de fosfato en aislamientos nativos colombianos de *Azotobacter* sp.
- Amplificar los genes *nifH* de aislamientos nativos colombianos de *Azotobacter* sp.

4. Metodología

4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron 25 aislamientos nativos de *Azotobacter* sp. obtenidos por Jiménez, (2007) en cultivos de hortalizas del altiplano cundiboyacense, conservados en glicerol 20% a -70°C. La reactivación de los aislamientos se realizó en caldo nutritivo a 28°C durante 21 horas a 120 rpm (Anexo 1). Después de recuperados, los aislamientos fueron sembrados en agar nutritivo durante 20 horas a 28°C y se confirmó la pureza macro y microscópicamente. (Jiménez *et al*, 2007).

Como control positivo fue utilizada una cepa *Azotobacter vinelandii* aislada por Toro, (2006) a partir de suelo de cultivo de papa en Boyacá, codificada como cepa CT y caracterizada bioquímica y molecularmente por Jiménez, (2007). Como control negativo fue utilizada una cepa de *E. coli* DH5 α donada por el cepario de bacterias de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.2 Preparación del banco de trabajo

A partir de los aislamientos recuperados se realizó la construcción del banco de trabajo en crioviales de 2 ml con 0,7 ml de cultivo bacteriano, 0,7 ml de caldo nutritivo y 0,6 ml de glicerol al 30%. El banco de trabajo fue almacenado a -25°C y -70°C.

4.3 Extracción de DNA genómico

Con el fin de obtener el ADN genómico para la prueba de PCR, se inoculó 10 µl de cada uno de los aislamientos de *Azotobacter*. en 10 ml de caldo nutritivo en tubos falcon de 50 ml a temperatura ambiente por 18 horas a 170 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se realizó la extracción de DNA genómico de los 25 aislamiento utilizando el Wizard® *genomic DNA purification kit for isolation of genomic DNA from Gram negative bacteria* de Promega. (anexo 2).

4.3.1 Determinación de cantidad y pureza del DNA genómico

La verificación de la pureza y de la concentración del DNA extraído se realizó en un equipo Thermo Scientific Nano Drop™1000 (Labtech International, UK). El DNA se cuantificó con base en el valor de absorbancia a 260 nm y fue expresado como ng µL. Una disminución en la relación de absorbancia a 260/230nm (<1,2) y 260/280 (<1,7) se utilizó como indicador de la presencia de compuestos contaminantes.

4.3.2 Evaluación de la calidad del DNA genómico

Para determinar la calidad del ADN genómico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con TAE 1X teñido con sybersafe 1X de acuerdo al protocolo propuesto por Sambrook et al (2001). El corrido electroforético se llevó a cabo en una cámara de electroforesis (C.B.S scientific EPS-300 IIV) a 80 V. 400 mA durante 35 minutos. Se utilizó como marcador de peso molecular 1kb DNA ladder de Promega.

4.4 Amplificación por PCR del gen *nifH*

Con el fin de confirmar la presencia del gen *nifH* en los aislamientos de *Azotobacter*, se realizaron amplificaciones de PCR a partir de las extracciones obtenidas en el numeral 4.3 utilizando 100 ng de ADN, 0,5 µM de *primer* degenerado PolF con secuencia TGCCAYCGSAARGCBGACTC, 0,5 µM de *primer* degenerado PolR con secuencia ATSGCCATCATYTCRCCGGA. (Gaby y

Buckley 2001), 0,2 mM de cada dNTP, 2 U de ADN polimerasa (go taq® flexi DNA polymerasa de Promega) y solución buffer de PCR 1X. Todas las reacciones se llevaron a un volumen final 50 µl (anexo 4). Los *primers* PolF, PolR así como el control positivo fueron donados por el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI). El tamaño esperado del amplicón corresponde a 162 pb.

La PCR consistió en un ciclo inicial de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C y un último ciclo de 5 min a 72°C. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador T100tm thermal cycler de BIO-RAD. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y se tiñeron con sybersafe 1X (Monrozier *et al*, 2001).

4.5 Evaluación de la capacidad fosfato solubilizadora de aislamientos de *Azotobacter*

Para la cuantificación de la solubilización de fosfatos, se inoculó 10 µl de cada aislamiento en 50 ml de caldo NBRIP (anexo 5) en erlenmeyer de 100 ml, estas se llevaron a agitación a 28°C, 150 rpm durante 72 horas en un shaker innova® 44 incubator (New Brunswick Scientific). Terminado el tiempo de incubación se pasó 10 ml de cada aislamiento a tubos falcon de 15 ml, los tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos, posteriormente se pasó 5 ml del sobrenadante a tubos 16×150 tapa rosca y por último a cada tubo se agregó 5 gotas del reactivo PO₄⁻¹ y 1 microcucharada del reactivo PO₄⁻², ambos reactivos del Test de fosfatos Spectroquant® de Merck. Pasados 5 minutos se realizó una dilución de 1/8 en celdas de 1ml y se registró la absorbancia a 899nm en un espectrofotómetro Genesys 10_{uv} (Thermo spectronic).

4.5.1 Curva patrón de ortofosfatos

Con el fin de determinar la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorbancia del ortofosfato, se preparó una solución de H₂PO₄ (500 ml) con concentración final de 50 ppm. A partir de esta solución se tomaron 5ml, a los cuales se agregó 5 gotas del reactivo PO₄⁻¹ y 1 microcucharada del reactivo PO₄⁻². Ambos reactivos son del Test de fosfatos Spectroquant® de Merck. Pasados 5 minutos se pasó 1 ml de la muestra a una celda de cuarzo y se realizó un barrido espectral en un rango de longitud de onda desde 226 hasta 999 nm. El procedimiento anteriormente descrito, se realizó de acuerdo con el manual 355,2 de la United States Environmental Protection Agency (EPA). La máxima absorbancia se registró a una longitud de

onda de 889 nm (anexo 4). La curva espectral se realizó en el espectrofotómetro Genesys 10_{uv} de Thermo spectronic.

Una vez establecida la longitud de onda en la que se detecta la máxima absorbancia, se procedió a elaborar la curva patrón. Para la realización de la curva patrón de ortofosfatos se utilizó el procedimiento propuesto por la EPA, método 365,1 para la determinación de fosfatos por colorimetría semi-automática. Siguiendo este método se prepararon concentraciones de 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 ppm de H₂PO₄, de cada una de las soluciones se tomaron 5ml a los cuales se les agregó cinco gotas del reactivo PO₄⁻¹ y una microcucharada del reactivo PO₄⁻². Ambos reactivos del Test de fosfatos Spectroquant[®] de Merck. Pasados 5 minutos se pasó 1 ml de cada muestra a una celda y se registró la absorbancia a 899nm, este proceso se realizó por triplicado (anexo 5) obteniendo un R²=0,996 y la correspondiente ecuación de la recta: $y = 0,7035x + 0,0027$. Todas las absorbancias se tomaron en el espectrofotómetro Genesys 10_{uv} de Thermo spectronic.

5. Resultados

5.1 Aislamiento primario

Después de 21 horas de cultivo en agar nutritivo, los aislamientos de aislamientos nativos de *Azotobacter*. fueron caracterizados fenotípicamente y clasificados de acuerdo a su crecimiento como: alto, medio y bajo. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización fenotípica de cepas nativas de *Azotobacter* spp. después de 21 horas de cultivo en caldo nutritivo.

Cepa	Morfología de la colonia	Morfología celular
C1BR	B	G
C2BR	C	G
C3BR	B	G

C4BR	C	G
C5BR	B	G
C1T	B	G
C2T	B	G
C3T	C	G
C4T	B	G
C5T	B	G
C1E	C	G
C2E	C	G
C3E	B	G
C4E	B	G
C5E	B	G
C1CA	B	P
C3CA	B	P
C4CA	B	P
C5CA	C	P
C1CO	B	G
C4CO	B	G
C5CO	C	G
C1Z	B	P
C2Z	C	P
CT	C	Q

B: Colonias color crema, medianas, brillantes e irregulares **G:** Bacilos Gram negativos grandes **C:** Colonias pequeñas, brillantes y transparentes **Q:** Quistes (estructura de resistencia) **P:** Bacilos Gram negativos pequeños

En la Figura 2 se pueden observar las características macro y microscópicas de algunos de los aislamientos de *Azotobacter* spp. después de 21 horas de cultivo en agar nutritivo.



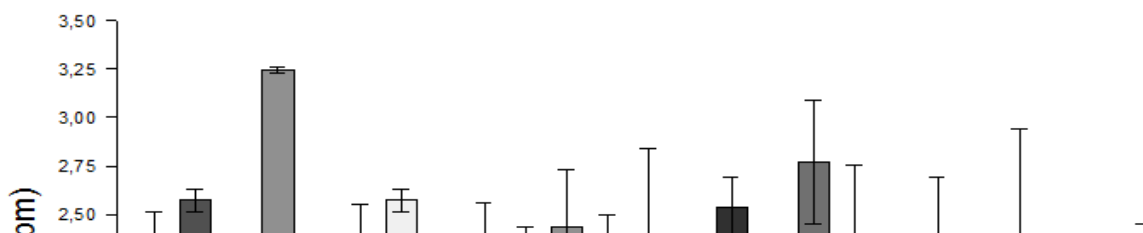
Fig2. A. Bacilos Gram negativos pequeños, cepa C1Z **B.** Cepa C2BR colonias pequeñas, brillantes y transparentes **C.** Quistes cepa CT

5.2 Cuantificación de solubilización de fosfatos

Se cuantificó la solubilización de fósforos utilizando el Test de fosfatos Spectroquant® de Merck después de 72 horas de incubación de los aislamientos de *Azotobacter* spp en caldo NBRIP. Como se observa en la figura 3, 24 de los 25 aislamientos presentaron actividad solubilizadora de fosfatos con excepción de la cepa C4CO, que en las dos réplicas no presentó actividad alguna. También se observó que el aislamiento con mayor actividad solubilizadora es C3T que presentó una concentración de fósforo soluble de 3,247 mg/l siendo también la que tiene el coeficiente de variación más bajo. El aislamiento C4T presentó la concentración de fósforo soluble más baja dentro del grupo de cepas que solubilizaron fósforos con 0,743mg/l. El 80% de los aislamientos de *Azotobacter* presentaron una concentración de fósforo soluble superior a 1,5 mg/l.

En la figura 4 se presenta la actividad solubilizadora de fosfato de los aislamientos según el cultivo de donde fueron obtenidos. El aislamiento C3T, proveniente de cultivo de tomate, es la cepa con mayor actividad solubilizadora (3,247 mg/l), mientras que la cepa C4T es la de menor solubilización (0,743mg/l). Los aislamientos obtenidos de cultivos del zanahoria y espinaca presentaron una concentración de fósforo soluble por encima de 2.0 mg/l como se observa en la Figura 4B. Los resultados de solubilización de fosfatos para los aislamientos C2T, C4T, C5T, C4E, C5E, C1BR, C2BR y C5BR no son concluyentes, debido a que se obtuvieron coeficientes de variación superiores al 25%.

Los aislamientos C1T, C3T, CIZ, C3E, C3CA y C5CA presentaron actividad solubilizadora de fósforos superior a la cepa control CT (*Azotobacter vinelandii*) para la que se obtuvo una concentración de 2,345 mg/l.



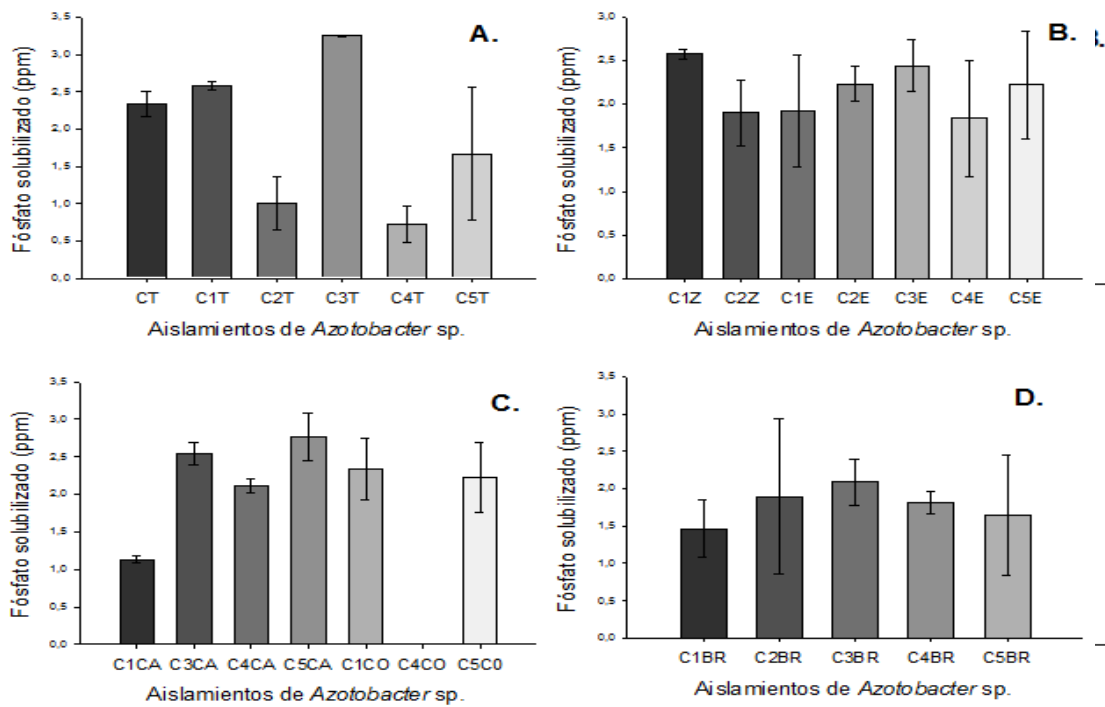


Fig4. Actividad solubilizadora de fosfatos, en ppm, de aislamientos colombianos de *Azotobacter* sp. Control positivo cepa CT (*Azotobacter vinelandii*) **A** aislamientos de cultivos de tomate **B** aislamientos de cultivos de espinaca y zanahoria **C** aislamientos de cultivos de calabacín y coliflor **D** aislamientos de cultivo de brócoli

5.3 Determinación de la presencia de genes *nifH* en aislamientos de *Azotobacter*

5.3.1 Extracción DNA genómico de aislamientos de *Azotobacter* spp.

Para la extracción del DNA genómico de los aislamientos de *Azotobacter* sp. Primero se realizó una incubación de 18 horas en 10 ml de caldo nutritivo a temperatura ambiente y 150 rpm. Una vez alcanzada una densidad óptica de 0,50 se procedió a utilizar el Wizard® genomic DNA purification kit for isolation of genomic DNA from Gram negative bacteria de Promega. Con este kit se realizó la extracción de ADN genómico de alto peso molecular de los 25 aislamientos en estudio, más el control positivo la cepa CT (*Azotobacter vinelandii*). Una vez terminadas las extracciones se procedió a determinar la pureza y cantidad de DNA extraído. En la Figura 5 se observa que el DNA extraído de los aislamientos presenta buena calidad y no se encuentra degradado, obteniendo bandas únicas con peso superior a la banda de 10 Kb del marcador de peso molecular. También es posible observar en los carriles 9, 14, 16, 17 y 18 la presencia de RNA lo cual baja la calidad de las extracciones de estos aislamientos. En el carril 15 no se observa ADN de alto peso molecular para el aislamiento C3BR, sin embargo, en una electroforesis posterior se confirmó la presencia de DNA de alto peso molecular no degradado.

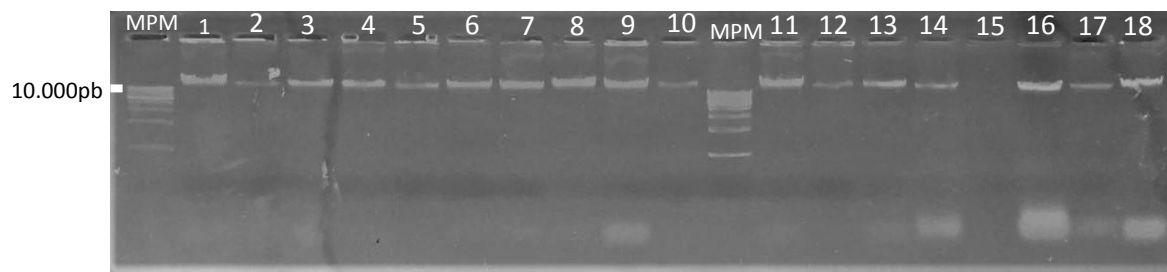
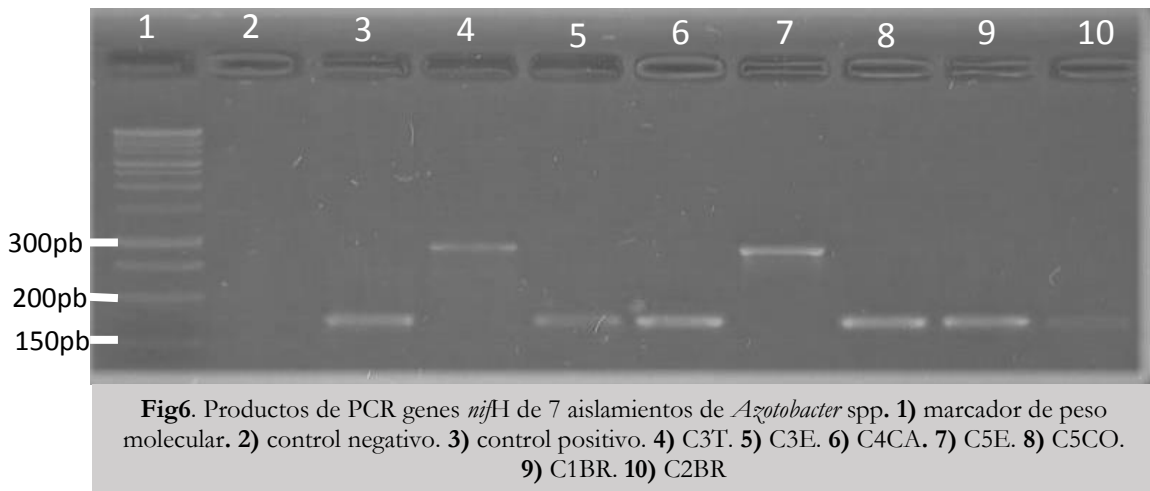


Fig5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, extracción de DNA genómico de aislamientos de *Azotobacter* sp. **MPM)** Marcador de peso molecular. **1)** C3T. **2)** C2Z. **3)** C1E. **4)** C3E. **5)** C4E. **6)** C5E. **7)** C1CA. **8)** C3CA. **9)** C4CA. **10)** C5CA. **11)** C1CO. **12)** C4CO. **13)** C5CO. **14)** C1BR. **15)** C3BR. **16)** C2BR. **17)** C4BR. **18)** C5BR.

5.4 Amplificación del gen *nifH*

Una vez realizada la extracción de DNA genómico, se confirmó la presencia del gen *nifH* en 10 aislamientos. Para la amplificación se llevó a cabo una PCR utilizando los *primers* específicos PolF y PolR, los cuales generan un producto de 162 pb. Como se observa en la Figura 6, los productos de los carriles 5, 6, 8, 9 y 10 migran de forma equivalente al producto amplificado del control positivo (carril 3). De otra parte, se observa que los productos de PCR de los carriles 4 y 7 (aislamientos C3T y C5E) tienen un tamaño aproximado de 300 pb, que equivale,

aproximadamente al doble del tamaño esperado para la amplificación del gen *nifH* con estos *primers*.



5.5 Selección de aislamientos de *Azotobacter* spp. con potencial biofertilizante.

Una vez realizada las pruebas de solubilización de fosfatos y presencia del gen *nifH*, se procedió a definir cuál/es cepas podrían tener el potencial para ser usadas como biofertilizantes. Para esto se realizó un análisis integrado teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente por Quintero en 2016 y que se relacionan con cinética de crecimiento de los aislamientos y su capacidad para producir Acido Indol Acético (AIA).

En la Figura 7 se observa de manera integrada la actividad solubilizadora de fosfatos y la producción de ácido indol acético. Ambas características fueron evaluadas al final de la fase exponencial (72h) en 6 aislamientos con presencia confirmada de genes *nifH*, Se observó que en los aislamientos C3E, C5E, C1BR Y C2BR la producción de AIA fue elevada en comparación con la actividad solubilizadora de fosfatos, mientras que en los aislamientos C4CA y C5CO la solubilización fue mayor en comparación con la producción de AIA. El aislamiento C1BR obtuvo la mayor producción de AIA (302 mg/l) con un coeficiente de error del 1%, el aislamiento que presentó la mayor solubilización de fosfato fue C3E con un coeficiente de variación de 12,17%.

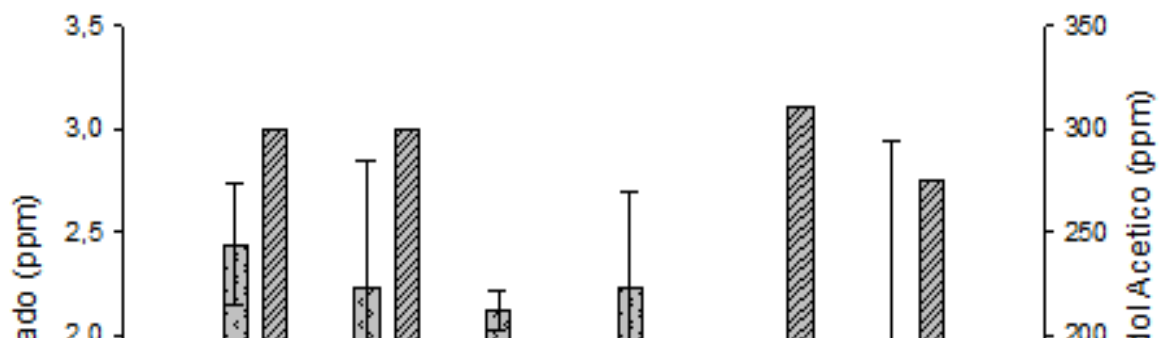


Tabla2. Comparación de aislamientos de *Azotobacter* spp. basado en la velocidad de crecimiento producción de (AIA) y solubilización de ortofosfatos a 72 horas.

Aislamiento	Biomasa g/l	Producción ácido indol acético ppm	Solubilización fósforos ppm
C3E	29,55	302,45	2,436
C5E	20,11	300,11	2,221
C4CA	27,45	175,87	2,113
C5CO	26,12	160,38	2,226
C1BR	26,34	310,54	1,467
C2BR	31,66	275,28	1,898

En la tabla 2 se comparan la velocidad de crecimiento, producción de AIA y la solubilización de fosforos de 6 aislamientos de *Azotobacter* spp con presencia de gen *nifH*. Se logró determinar que solo el aislamiento C1BR presentaba baja solubilización de fosforos, todas las cepas presentaron

alta velocidad de crecimiento y producción de AIA con excepción de los aislamientos C4CA y C5CO. El único aislamiento que presentó valores altos para las tres variables fue C3E.

6. Discusión de resultados

La contaminación asociada a la utilización inadecuada de fertilizantes de base química alrededor del mundo está en aumento. Cada día sea hacen más evidentes los problemas ambientales por la acumulación de amonio y nitritos en el suelo. Los cuales por procesos de nitrificación y denitrificación generan intermediarios que se pierden por procesos de escorrentía, lixiviación y volatilización generando una huella ambiental producto del agro cada vez más grande (Yates y Kahindi, 1998).

Los biofertilizantes son una posible solución para detener o reducir el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados y fosfatados. Dentro de las ventajas que tienen los biofertilizantes es que usan microorganismos latentes que tienen características especiales que les permiten ayudar al crecimiento y desarrollo vegetal (Bellenger et al, 2013).

El género *Azotobacter* ha demostrado tener un gran potencial biofertilizante, esto se debe a su capacidad de fijar nitrógeno molecular y solubilizar fosfatos. Siendo el nitrógeno y el fósforo los dos elementos más importantes y limitantes del crecimiento y desarrollo vegetal. Otras de las características del género *Azotobacter* es que tiene producción de sideróforos, auxinas, giberelinas y exopolisacáridos que fomentan el crecimiento vegetal (Samah y Eweda, 2014).

En este trabajo se determinó el potencial biofertilizante de 25 aislamientos nativos de *Azotobacter* spp. basado en cuatro parámetros, solubilización de fósforo, presencia de genes *nifH*, producción de ácido indol acético y cinética de crecimiento.

Como se observa en la figura 2, todos los aislamientos con excepción del C4CO presentaron actividad solubilizadora. El mejor resultado se obtuvo para el aislamiento C3T con 3,214 mg/l. de fósforo soluble. Estos resultados son bajos en comparación a los obtenidos por Samah y Eweda (2014) en donde los rangos de solubilización se encuentran entre 8-55 ppm. Sin embargo, se tiene que tener en cuenta que nuestros resultados fueron tomados a las 72 horas de incubación, mientras que en el estudio de Samah y Eweda, 2014 se evaluó la solubilización de ortofosfatos en el tiempo 0 y a los 14 y 24 días. Lo cual explicaría las diferencias en las concentraciones. Otra

posible razón que puede explicar la baja concentración de fósforo soluble puede atribuirse al medio empleado, que en este caso fue NBRIP. Este medio contiene $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que impide la respiración asimilativa, reduciendo la liberación de protones y en consecuencia la capacidad de solubilización de las cepas de *Azotobacter*. Este mecanismo de solubilización acoplado a la respiración asimilativa del amonio es explicada por Vivek y Rishi, 2004, quienes lo describen como el segundo mecanismo utilizado por cepas de *Azotobacter* para solubilizar fosfatos. Según los autores, el primer mecanismo es a través de la producción de ácidos orgánicos y minerales. Aunque niveles de solubilización obtenidos en este trabajo fueron bajos, el 96% de los aislamientos presentó actividad solubilizadora. Este resultado contrasta con el estudio realizado por Acevedo y colaboradores en 2015, en donde solamente el 70% de los aislamientos presento actividad solubilizadora de fosfatos.

Amplificación de los genes *nifH*

Aunque se realizó la extracción de DNA genómico de todos los aislamientos, solo se determinó la presencia de gen *nifH* en los aislamientos C3T, C3E, C3E, C4CA, C5E, C5CO, C1BR, C2BR (Figura 6). Una de las posibles causas por las cuales no se realizó la identificación de gen *nifH* en todos los aislamientos es que los *primers* utilizados no eran específicos para el género *Azotobacter*. Otro posible motivo es que la concentración de alguno de los componentes de la reacción de PCR no fueron adecuados. Se encuentra documentado que las reacciones de PCR son sensibles a la concentración de Cloruro de Magnesio, pureza y concentración del ADN y temperatura de anillamiento de los *primers* (Liming y Jingang, 2016)

Como se observa en la figura 5, los productos de PCR obtenidos de los aislamientos C3E, C4CA, C5CO, C1BR y C2BR concuerdan en tamaño de 191pb reportado para los *primers* PolF y PolR, sin embargo, se observa que los productos de los aislamientos C3T y C5E tienen un tamaño de aproximadamente 300pb. Hasta el momento no existe información relacionada con productos de PCR de este tamaño utilizando los *primers* PolF y PolR. una posible explicación de este resultado, es que los *primers* hayan amplificado un gen homólogo conocido como *nifH** cuya presencia ha sido confirmada en *Azotobacter chroococcum*. Esta especie contiene un cluster de genes de fijación de nitrógeno (*nif*) que codifica la estructura polipeptídica de la nitrogenasa (*nifH* para la dinitrogenasa-Fe mientras que *nifD* y *nifK* codifican para la dinitrogenasa Mo-Fe), en los estudios realizados por Robson y Woodley en 1986, se encontró una segunda secuencia en el genoma de *A. chroococcum* homologa a *nifH*. A esta secuencia homóloga se le dio el nombre

putativo de gen *nifH*^{*}, por medio de técnicas de clonación se llegó a determinar que esta secuencia codificaba para una proteína de 289 aminoácidos seguida por un *Open Reading Frame* ORF que codifica una proteína de 63 aminoácidos, que muestra homología con ferredoxinas encontradas en bacterias anaeróbicas. En nuestro trabajo es posible que los *primers* amplificaron la secuencia del gen *nifH*^{*} en los aislamientos C3T y C5E lo cual explicaría el producto de 300pb obtenido en la electroforesis (fig 6). Con base en estos resultados podemos sugerir que estos aislamientos corresponden a cepas de *A. chroococcum*. En el trabajo realizado por Jiménez y colaboradores en 2007 ya se había advertido sobre la posibilidad de que estos dos aislamientos podrían ser de *A. chroococcum*. El análisis de restricción virtual del gen 16SrDNA (ARDRA) realizado por estos autores mostró que la cepa C5E presenta una similitud de 0,95 con la cepa C5T, que por secuenciación fue confirmada como *A. chroococcum*.

Análisis comparativo de las características de los aislamientos

En la tabla 2. se compara los aislamientos C3T, C3E, C4CA, C5E, C5CO, C1BR y C2BR. De acuerdo con su actividad solubilizadora de fosfatos, crecimiento y producción de ácido indol acético. Se busca que los aislamientos escogidos para formular un biofertilizante sean las que mayores resultados presentaron de todas las características (Surendra y pallavi, 2006), de tal manera que los aislamientos con posible potencial biofertilizante son C3E, C5E y C2BR. Aunque estos aislamientos son los que presentaron mejores resultados para los tres parámetros, aún no se puede descartar el uso de los otros aislamientos. Ya que una es la actividad registrada en el laboratorio y otra muy diferente la que se puede observar en campo. Esto sucede porque en laboratorio no se puede reproducir todas las condiciones que pueden influenciar negativa o positivamente la actividad de un microorganismo, como lo mostró el estudio realizado por Nosrati y colaboradores en 2013, donde los aislamientos Ps-21 Y Mac-27 presentaron tasas de fijación de nitrógeno en campo 32% menores a lo obtenido en laboratorio.

7. Conclusiones

- Se determinó que 24 de los 25 aislamientos de *Azotobacter* spp. Que corresponden a el 80% de los aislamientos estudiados, presentaron actividad fosfato solubilizadora superior a 2.234 mg/l

- Se determinó la presencia del gen *nifH* en 10 aislamientos (C2E, C3E, C5E, C3T C4CA, C5CA, C5CO, C1BR, C2BRy C4BR)
- Con base en los resultados obtenidos se puede sugerir que los aislamientos C3E y C5E podrían corresponder a *A. chroococcum*
- Se puede concluir que los aislamientos C3E, C5E y C2BR son promisorios para ser utilizados en un biofertilizante debido a la capacidad de solubilizar fosfatos y producir altas concentraciones de AIA

8. Recomendaciones

- Se sugiere evaluar la fijación libre de nitrógeno de las 24 cepas, mediante un ensayo de reducción de acetileno (ARA) y cuantificarla por cromatografía de gases con el fin de determinar la capacidad fijadora de nitrógeno.
- Se sugiere evaluar la presencia de sideróforos en los aislamientos de *Azotobacter* spp. Por ser otro de los aspectos considerados al momento de seleccionar cepas con potencial uso como biofertilizante
- Se sugiere evaluar los aislamientos C3E, C5E y C2BR en ensayos in vivo, bajo condiciones de invernadero.

9. Bibliografía

- Abdel-Aziez S, Eweda W, Girgis M, Ghany B (2014) Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *Azotobacter* as N₂ biofertilizer, *Annals of Agricultural Science* 59: 95–108
- Acevedo E, Galindo T, Prada F et al (2013) Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in colombia. *Applied Soil Ecology* 80: 26-33
- Aquilanti L, Favilli F, Clementi F (2004) Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples, *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1475–1483.
- Avdalović J, Beškoski V, Gojgić-Cvijović G et al Microbial solubilization of phosphorus from phosphate rock by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* sp. B2. *Minerals Engineering* 72: 17–22

- Bashan Y, Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant soil* 378:1-33 DOI 10.1007/s11104-013-1956-x
- Bellenger JP, Xu Y, Zhang X, Morel FM, Kraepiel AM (2013) Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 69: 413- 420
- Bobadilla C, Rincon S (2008) aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia
- Bhatti T, Yawar W (2010) Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud. *Hydrometallurgy* 103: 54–59
- Bellenger J, Xu Y, Zhang X (2013) Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 69: 413–420
- Cherkasov N, Ibadon O, Fitzpatrick P (2015) A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing* 90: 24–33
- Coelho M, Marriel I, Jenkins S et al (2009) Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology* 42: 48–53
- Coskun D, Britto D, Kronzucker H (2016) Nutrient constraints on terrestrial carbon fixation: The role of nitrogen. *Journal of Plant Physiology* 203: 95–109
- Divito G, Sadras V (2013) How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *Field Crops Research* 156: 161–171
- Dhandhukia PC, Goswami D, Thakker JN (2015) Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan using HPTLC. *Journal of microbiological methods* 110:7-14doi: 0.1016/j.mimet.2015.01.001

- Dermenaki N, Hamed J (2012) Isolation of *Azotobacter* sp. from soil with potential as biofertilizer. *New Biotechnology* 29: 23–26
- Delgadillo O, Garcia R, Forero J (2015) Fertilising techniques and nutrient balances in the agriculture industrialization transition: The case of sugarcane in the cauca river valley (Colombia), 1943-2010. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 218: 150-162.
- Franche C, Santi C, Bogusz D (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany* 111:743-767 doi:10.1093/aob/mct048
- Gupta M, Kiran S, Gulati A, Singh B, Tewari R (2012) Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller, *Microbiological Research* 167: 358–363
- Garg S, Bhatnagar A, Kalla A (2001) In vitro nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresource Technology* 80: 101–109
- Irian S, Dadook M, Mehrabian S, Mitra S (2014) Morphological, biochemical and molecular characterization of twelve nitrogen-fixing Bacteria and their response to various Zinc concentration. *Jundishapur journal microbiology* 7(4): e91415
- Jing Z, Qingye S (2011) Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in the rhizosphere and non-rhizosphere of pioneer plants growing on wastelands of copper mine tailings. *Microbiological Research* 167: 157–165
- Kennedy R, Choudhury A, Kecskés P (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1229–1244
- Kizilkaya R (2008) Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains, *ecological engineering* 33: 150–156
- Kantachote D, Numkaew T, Kantha T, Chaiprapat S (2016) Biofertilizers from *Rhodopseudomonas palustris* strains to enhance rice yields and reduce methane emissions, *Applied Soil Ecology* 100: 154–161

- Kızılkaya R (2008) Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering* 33: 150–156
- Liu Z, Yuncong C, Li S, Zhang Y et al (2015) Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology* 96: 217–224
- Levy-Booth D, Prescott C, Grayston S (2014) Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 75: 11–25
- Nosrati R, Owlia P, Saderi H, Rasooli I, Ali M (2013) Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains, *iranian journal of microbiology* 6(4): 285-295
- Nüsslein K, Izquierdo JA (2015) Variation in diazotrophic community structure in forest soils reflects land use history. *Soil biology and biochemistry* 80:1-8
- Orozco J, Martinez P (2009) Evaluation of inoculation with asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms isolated from rhizosphere of *Pinus patula* in Colombia, *BOSQUE* 30(2): 70-77
- Poly F, Monrozier L, Bally R (2001) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol* 152: 95-103
- Rui L, Rui T, Ning L (2016) Chemical, organic and bio-fertilizer management practices effect on soil physicochemical property and antagonistic bacteria abundance of a cotton field: Implications for soil biological quality. *Soil and Tillage Research* 167: 30–38
- Reis VM, Divan VL, Baldani JI (2015) Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. In: Cassán FD et al. *Handbook for Azospirillum*. Springer International Publishing. Switzerland, pp 3-26
- Rotaru V, Sinclair T (2008) Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. *Environmental and Experimental Botany* 66: 94–99

- Ramani V (2011) Effect of pesticides on phosphate solubilization by *Bacillus sphaericus* and *Pseudomonas cepacia*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99: 232–236
- Ravikumar S, Kathiresan K, Ignatiammal S et al (2004) S. Ravikumar, a, , K. Kathiresanb, S.Thadedus Maria Ignatiammalc, M. Babu Selvama, S. Shanthya. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 312: 5–17
- Robson R, Woodley P, Jones R (1986) Second gene (*nifH**) coding for a nitrogenase iron protein in,4 *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein. *The EMBO Journal* 5: 1159-1163
- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339
- Samah M, Eweda W ,Girgis M (2014) Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *Azotobacter* as N₂ biofertilizer. *Annals of Agricultural Sciences* 59: 95–108
- Saribay G (2003) Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* nitrogen-free and own containing medium. Tesis de maestria en ciencias aplicadas. Departamento de Ingeniería de alimentos. *The Middle East Technical University*. Turkia
- Smith L, Siciliano G (2015) A comprehensive review of constraints to improved management of fertilizers in China and mitigation of diffuse water pollution from agricultura. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 209: 15–25.
- Sambrook, J., & Rusell, D. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. (Third ed.). New York.
- Thilagar G, Bagyaraj D, Rao M (2015) Selected microbial consortia developed for chilly reduces application of chemical fertilizers by 50% under field conditions. *Scientia Horticulturae* 198: 27–35
- Vaneckhaute C, Meers E, Michels E (2013) Ecological and economic benefits of the application of bio-based mineral fertilizers in modern agricultura. *Biomass and Bioenergy* 49: 239–248

- Valderrama LC (2013) Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp). Tesis de maestría en ingeniería sanitaria y ambiental. Facultad de ingeniería. *Universidad del Valle*. Colombia.

- Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* 10(3):293-319 doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>

- Vivek K, Rishi K, Neeru N (2004) Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological Research* 156: 87-93

- Wani SA, Chand S, Ali T (2013) Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production. *Current Agriculture Research Journal* 1(1): 35-38

- Wang Z, Miao Y, Sheng L (2015) Effect of ammonium and nitrate nitrogen fertilizers on wheat yield in relation to accumulated nitrate at different depths of soil in drylands of China. *Field Crops Research* 183: 211–224

- Wasmund N, Struck U, Hansen A et al (2015) Missing nitrogen fixation in the Benguela región. *Deep Sea Research* 106: 30–41

- Wang H, Liu S, Zhai L et al (2015) Preparation and utilization of phosphate biofertilizers using agricultural waste. *Journal of Integrative Agriculture* 14: 158-167

- Wakelin S, Gupta V, Forrester S (2010) Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N₂-fixing bacteria in Australian agricultural soils. *Pedobiologia* 53: 391–399

- Yates M, Kahindi J (1998) Oxygen, hydrogen and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 863-869

ANEXO 1

Medios de cultivo

- Agar nutritivo

Compuesto	g/L
Extracto de carne	3
Extracto de peptona	5
Agar	15

- Caldo NBRIP

Compuesto	g/l
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
MgCl ₂ 6H ₂ O	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
NaCl	0,2

MgSO ₄	0,25
KCl	0,2
pH	7

ANEXO 2

Protocolo extracción de DNA

Wizard[®] genomic DNA purification kit for isolation of genomic DNA from Gram negative bacteria

Instrucciones de uso del producto A1120

1. Centrifugar 1ml de cultivo bacteriano por 2 minutos a 13000 rpm, descartar el sobrenadante
2. Adicionar 600µl de Nucley Lysis Solution, re suspender el pellet pipeteando suavemente.
3. Incubar por 5 minutos a 80°C, dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Adicionar 200µl de Protein Precipitation Solution, agitar en vortex.
5. Incubar en hielo las muestras por 5 minutos.
6. Centrifugar 13000 rpm por 3 minutos.

7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo que contenga 600 μ l de isopropanol a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos, descartar el sobrenadante.
9. Adicionar 600 μ l de etanol, re suspender el pellet suavemente.
10. Centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm
11. Descartar el etanol y secar el tubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
12. Rehidratar el DNA con 100 μ l de Rehydration Solution por 1 hora a 65 $^{\circ}$ c.

ANEXO 3

Resultados nanodrop

Aislamiento	Cantidad de DNA (ng/μl)	Relación de pureza 260/280
CT	197,6	1,84
C1T	197,8	1,9
C2T	50,1	1,93
C3T	114,7	1,9
C4T	192,1	2,08
C5T	149,2	1,97
C1Z	100,4	1,98
C2Z	103,2	2,34
C1E	460,6	2,06
C2E	16	1,78

C3E	192,2	1,99
C4E	519,4	2,08
C5E	391,1	2,05
C1CA	74	2,02
C3CA	158,8	1,63
C4CA	54	1,99
C5CA	67,9	1,96
C1CO	7,5	1,73
C4CO	82,7	1,7
C5CO	36	1,55
C1BR	104,3	2,02
C2BR	167,2	2,08
C3BR	35,6	2,05
C4BR	105,5	2
C5BR	90,8	1,62

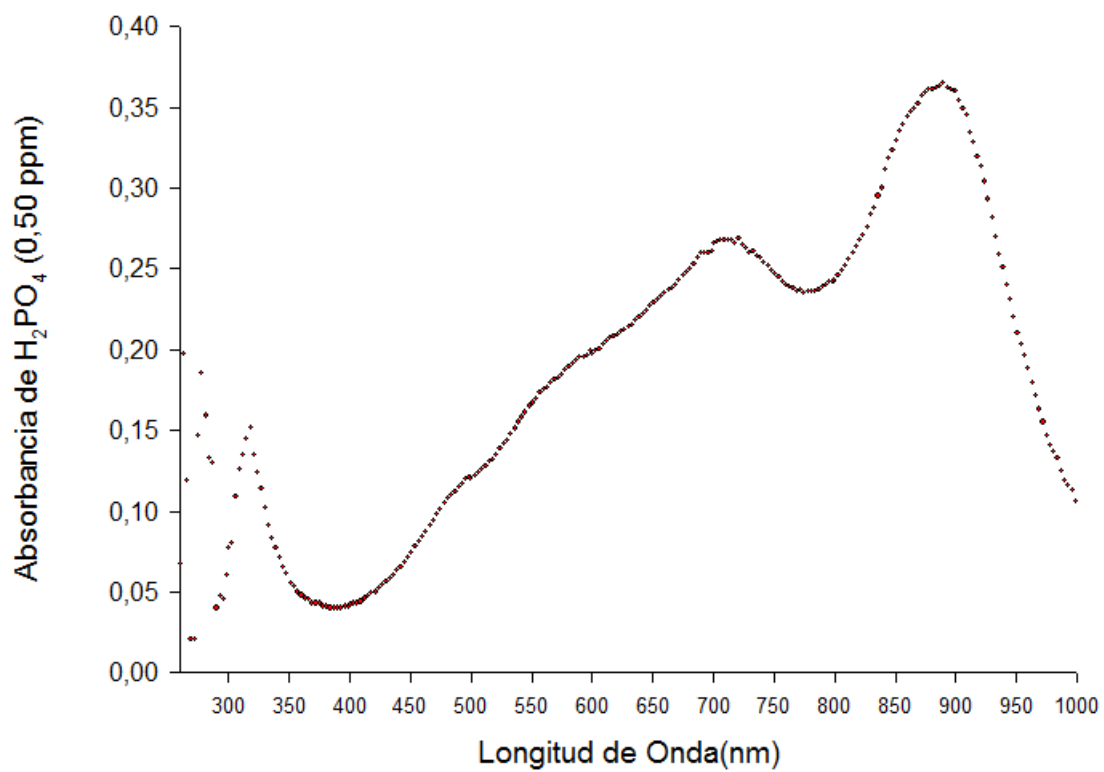
ANEXO 4Reactivos PCR

Preparación para PCR (μl)

DNA(μl)	Primer pol F(μl)	Primer pol R (μl)	dNTP (0,2 μM)	DNA polimerasa(2u)	MgCl₂ (μl)	1X Buffer (μl)	Agua (μl)	Total (μl)
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
2,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	30,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
4,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	28,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
7,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	25,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
2,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	30,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
2,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	30,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00
1,00	2,5	2,5	1	0,5	1,5	10	31,00	50,00

ANEXO 5

Curva espectral de ortofosfatos



ANEXO 6

Curva patrón de ortofosfatos

