

EVALUACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN SUELOS DEL BOSQUE SECO TROPICAL DEL DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO

Castro Álvarez María Fernanda, Martínez Castaño María Alicia, Elwi Machado, Yani Aranguren.

VIII semestre. Universidad Simón Bolívar. Barranquilla, Atlántico.

RESUMEN

Introducción: El bosque seco tropical (BST) es uno de los ecosistemas más alterados en el mundo. Este se ha reducido debido al aumento de tierras agropecuarias, mineras y urbanas; generando una alteración del paisaje y en la microbiota del suelo. Por lo cual, es necesario determinar el estado de las comunidades microbianas existentes; especialmente promotores del crecimiento vegetal, que puedan implementarse en su recuperación. **Materiales y Métodos:** Se evaluó la diversidad de bacterias fijadoras del nitrógeno de suelos naturales e intervenidos del BST del departamento del Atlántico. Para ello, se aislaron bacterias y se comparó la diversidad. Los aislados fueron caracterizados macro y microscópicamente, se evaluó su capacidad para fijar nitrógeno, la presencia de genes involucrados en este metabolismo; y el potencial solubilizador de fosfato. Paralelamente, se hizo análisis fisicoquímico y respiración basal de estos suelos. Por último, identificaron genes relacionados a estos metabolismos. **Resultados:** Se observó mayor diversidad en el suelo natural que en el intervenido. Se obtuvieron seis aislados diferentes, con capacidad fijadora de nitrógeno y dos de ellos son solubilizadores de fosfato. Estos últimos mostraron crecimiento rápido, y se determinó que potencialmente no son patogénicos. **Conclusión:** La intervención del BST afecta negativamente la diversidad bacteriana del suelo, incluyendo microorganismos promotores del crecimiento vegetal. En consecuencia, la pérdida de las comunidades microbianas del suelo debe afectar la capacidad de recuperación del bosque. Los aislados obtenidos, potencialmente podrán ser usados como inoculantes para restaurar el BST; así como en el desarrollo de la agricultura sostenible en la región.

Palabras clave: Abundancia, bosque seco tropical, diversidad, Fijadores de nitrógeno, solubilización de fosfato, promotores del crecimiento vegetal.

ABSTRACT

Introduction: The tropical dry forest (BST) is one of the most altered ecosystems in the world. This has been reduced due to the increase in agricultural, mining and urban lands; generating an alteration of the landscape and in the soil microbiota. Therefore, it is necessary to determine the status of the determined microbial communities; especially plant growth promoters, which can be implemented in their recovery. **Materials and Methods:** The diversity of nitrogen fixing bacteria of natural and intervened soils of the BST of the Atlantic department was evaluated. To do this, bacteria were isolated and diversity was compared. The isolates were characterized macro and microscopically, their ability to fix nitrogen was evaluated, the presence of

genes involved in this metabolism; and the phosphate solubilizer potential. In parallel, physicochemical analysis and basal respiration of these soils were made. Finally, they identified genes related to these metabolisms. **Results:** Greater diversity was observed in the natural soil than in the intervention. Six different isolates were obtained, with nitrogen fixing capacity and two of them are phosphate solubilizers. The latter showed rapid growth, and it was determined that they are potentially not pathogenic. **Conclusion:** The decrease in BST negatively affects the bacterial diversity of the soil, including plant growth promoting microorganisms. Consequently, the loss of soil microbial communities should affect the resilience of the forest. The isolates obtained can potentially be used as inoculants to restore the BST; as well as in the development of sustainable agriculture in the region.

Keywords: Abundance, tropical dry forest, diversity, nitrogen fixers, phosphate solubilization, plant growth promoters.

INTRODUCCIÓN

El bosque seco tropical (BST) es una formación vegetal que presenta una cobertura boscosa continua, el cual se distribuye entre 0 y 1.000 m de altitud, presenta temperaturas superiores a 25°C, y las precipitaciones son del orden de 700 y 2.000 mm anuales, con uno o dos períodos marcados de sequía al año (1). Otra característica importante de estos ecosistemas es la relación entre la evapotranspiración potencial y las precipitaciones; que marca la respuesta de adaptación que poseen sus especies contra las sequías. En la mayoría de estos bosques predominan los árboles caducifolios, que durante las estaciones secas pierden las hojas o el follaje; que es una de las principales adaptaciones fisiológicas de las plantas al déficit de agua (2).

El BST es considerado uno de los ecosistemas más alterados y menos conocidos a nivel mundial, representando actualmente solo el 3% de la cobertura original del bosque debido a actividades antrópicas (3). Además, este ecosistema presenta condiciones de sequía, lenta capacidad de regeneración, poco reclutamiento de plántulas y bajas tasas de crecimiento (4).

Dadas las características topográficas de planicie y la riqueza del suelo, el BST ha sido sustituido por zonas de cultivos y ganadería extensiva en todo el país (5). El estado de conocimiento del BST en Colombia es escaso y la mayor parte de los trabajos son inventarios de flora y fauna (6). En relación al suelo, existen pocos estudios sobre su dinámica y diversidad microbiana. Por ello se hace indispensable, como punto de partida, la realización de estudios sobre las comunidades existentes que involucren el conocimiento de la estructura, dinámica, funcionamiento y composición de especies del BST (7). Este en Colombia se encuentra ubicado en la región el Caribe, los valles interandinos de los ríos Cauca y Magdalena, la región NorAndina en Santander y Norte de Santander, el valle del Patía, Arauca y Vichada en los Llanos. Sin embargo, sin un lineamiento y unos objetivos claramente definidos a largo plazo, estos estudios no brindan de manera adecuada la información necesaria para evaluar los procesos de intervención sobre estos ecosistemas (8).

En el municipio de Luruaco y de Baranoa hay una reducción del hábitat original, debido al aumento de las zonas utilizadas para cultivos agrícolas como la yuca, ñame, maíz,

frutales como el mango, y la minería representada en la explotación de piedra caliza; generando una alteración del paisaje y un posible cambio en la microbiota del suelo (9). Por lo cual, se hace urgente determinar el estado de estos bosques a partir del estudio y evaluación de la microbiota existente en los suelos, los cuales son los componentes más importantes de este, responsables de la dinámica de transformación y desarrollo. En un solo gramo de suelo, encontramos millones de microorganismos beneficiosos para los cultivos, bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios. Asimismo, en la agricultura tradicional, se planta siempre en la misma línea de terreno, por lo que la degradación del suelo es más rápida.

Un suelo fértil contiene reservas adecuadas de elementos nutritivos disponibles para la planta, o una población microbiana que libere nutrientes que permitan un buen desarrollo vegetal. Especialmente promotores del crecimiento vegetal; que, a su vez, puedan implementarse para la recuperación de la diversidad microbiana del BST y sus estructuras originales. Por consiguiente, se plantea como objetivo el aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras del nitrógeno pertenecientes de suelos naturales e intervenidos del BST del municipio de Luruaco, departamento del Atlántico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Este estudio fue efectuado durante el mes de junio del 2019. La toma de muestra se realizó basándonos en la guía de toma de muestra de suelo del ministerio del medio ambiente. Posterior a esto se realizó en dos localidades del departamento del Atlántico. El primer muestreo fue en una zona conservada de la finca 33, San Juan de Tocagua, Municipio Luruaco, departamento del Atlántico, ($10^{\circ}36' N$; $75^{\circ}08' O$), y el segundo muestreo en el parque biotemático Megua ubicado en Baranoa, Atlántico, ($10^{\circ}51' N$; $74^{\circ}54' O$). Se seleccionaron tres puntos de muestreo relacionados a diferentes estados de conservación del bosque: natural, secundario e intervenido. En cada punto, se trazó un transecto lineal de 26 m, en donde cada 10 m se marcó un polígono de $2m^2$ y se colectó suelo a una profundidad de 10cm en 5 puntos equidistantes por cada cuadrado, formando una muestra compuesta. Posterior a eso las muestras fueron refrigeradas a $4^{\circ}C$, transportadas y almacenadas en el Laboratorio de Investigación en Microbiología (LIM) de la Universidad Simón Bolívar.

Respiración basal del suelo

Para evaluar la respiración basal, se construyeron trampas de CO_2 empleando frascos herméticos y beakers con 15ml de NaOH (1,25M), para 100 g de suelo. Estos fueron incubados a $37^{\circ}C$ durante un periodo de tiempo de 28 días. La producción de CO_2 se estimó cada dos días, mediante titulación con 15 mL de HCl 1,25M, 200 μL de cloruro de bario ($BaCl_2$) al 2% y 2 gotas de fenolftaleína. Pasado un período de tiempo de 24 días se le adicionó a cada uno de los suelos, 1 mL de glucosa a una concentración de 1 mM, con la finalidad de proporcionarle sustrato a los microorganismos presente en este. Las mediciones del blanco se obtuvieron partir del NaOH utilizado para llenar las trampas y a medición de gas producido por la respiración del suelo se determinó con la siguiente formula:

$$R = \frac{(B - M)NE}{\# \text{ dias}}$$

Donde, R: respiración microbiana, B: volumen de ácidos necesarios para titular el NaOH del promedio de los blancos, M: cantidad de ácido necesaria para titular el NaOH de la muestra, N: normalidad del ácido clorhídrico y E: peso equivalente del CO₂. A cada valor de mg CO₂, se dividió por el número de día de incubación con el fin de saber el valor total de desprendimiento de CO₂ en miligramos de suelo.

Análisis fisicoquímico

Se realizó un análisis fisicoquímico de los suelos utilizando el Kit de Prueba de Análisis de Suelos LaMotte serie STH. Para ello se pesaron 10g de cada suelo, se diluyó en agua peptonada y se determinaron 14 parámetros: pH, nitrato nitrógeno, fósforo, potasio, humus, calcio, magnesio, amonio nitrógeno, manganeso, aluminio, nitrito nitrógeno, sulfato, cloruros y hierro.

Aislamiento y diversidad de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno

Se pesó 10g de suelo y se suspendió en 9ml de solución salina, se realizó microdiluciones hasta 10⁻⁶, Luego a partir de 10g suelo diluido en 90 ml de solución salina, se sembró por superficie en agar nutritivo y en medio ASHBY (manitol/glucosa 20g/L, fosfato dipotásico 0,2, sulfato de magnesio 0,2, cloruro de sodio 0.2, sulfato de potasio 0.1, carbonato de calcio 5, Agar 15). Estas se incubaron por 24 h a 37 °C y por 7 días a 30°C, respectivamente. Los cultivos se hicieron por triplicado. Luego, se contaron las colonias para determinar la abundancia y diversidad de microorganismos cultivables y bacterias fijadoras de nitrógeno.

Caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno

A partir de los aislamientos, se tomaron seis colonias fijadoras de nitrógeno morfológicamente diferentes y se hizo una siembra masiva en ASHBY para evidenciar la actividad fijadora. A partir de las bacterias aisladas se realizó una descripción de las características macroscópicas, una tinción de Gram, se determinaron las características microscópicas de las cepas seleccionadas y a cada uno se le asignó un código. Además, se realizó una prueba de capacidad hemolítica en agar sangre y se realizó una medición del índice de hemólisis, con la intención de hacer una evaluación rápida y descartar posibles microorganismos patógenos. Luego, se hizo un cultivo de colonias aisladas y puras en medio líquido Luria Bertani (LB), se incubaron a 37°C/250rpm/18h y se mezcló con glicerol (4:1) y se congeló a una temperatura de -80 °C. Estas se almacenaron en el cepario del Laboratorio de Investigación en Microbiología (LIM) de la Universidad Simón Bolívar.

Determinación de la actividad metabólica

A partir del cultivo líquido se realizó una siembra por gota (2 µL) en el medio de cultivo NBRIP (glucosa 5g/L, fosfato de calcio 5, sulfato de hierro 0,125, cloruro de magnesio

hexahidratado 2,5, cloruro de potasio 0,1, Sulfato de amonio 0,05, azul de bromotimol 0,0125, agar 7,5) para probar si los aislados también tenían capacidad solubilizadora de fosfato. Posteriormente se realizó un promedio de la medición del índice de la actividad enzimática de cada colonia; utilizando la siguiente relación:

$$\text{Índice de actividad enzimática} = \frac{\text{Halo de hidrolisis}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Todo esto se realizó para determinar si los aislados presentan capacidad fijadora de nitrógeno como capacidad solubilizadora de fosfato.

Extracción de ADN genómico

Se realizó una extracción del ADN total de los seis cultivos en caldo LB usando el protocolo establecido por Rojas-Herrera (10). Para ello, se tomó 1ml de los diferentes cultivos, y se transfirió a tubos eppendorf, se centrifugó por 1 minuto a 12000 rpm y se eliminó el sobrenadante; repitiendo entre 3 veces según la densidad del cultivo. Luego, el pellet se resuspendió en 1ml de solución salina al 0,9% y se centrifugó por 1 minuto a 12000 rpm. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se añadió 600 µl de buffer de lisis y se incubó a una temperatura de 90 °C durante 10 minutos. Inmediatamente se transfirió a -20 °C para dar un choque térmico, se le agregó 1 Volumen de cloroformo, se mezcló por inversión 30 veces y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Sucesivamente se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo Eppendorf Tubes® 3810X, en donde se le agregó 2/3 de volumen de isopropanol, se mezcló por inversión, y se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm. Luego se eliminó el sobrenadante se agregó etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm, nuevamente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. Una vez seco y se agregó 50µL de agua destilada estéril y se guardó en refrigeración. Finalmente, del ADN extraído, se realizó una electroforesis en el gel de agarosa al 0,8% y se corrió durante 30 minutos a 80 V, para verificar la integridad del ADN.

Verificación molecular de actividad promotora de crecimiento

Para verificar si los aislados poseen genes implicados en el metabolismo relacionado a la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato; se amplificó el gen de la nitrogenasa NifH y el gen del cofactor pyrroloquinolina quinona PQQE, la cual estimula el crecimiento y sirve como un cofactor para una clase especial de enzimas que intervienen en la función celular, incluyendo el crecimiento y desarrollo celular, respectivamente. Se hicieron reacciones individuales de 15 µL usando 2X de Taq Polimerasa PCR-100-2X (Tris 10 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, dNTPS 0,15 mM, polimerasa 0,5 U). Para la preparación de la mezcla de reacción se tuvo en cuenta los siguientes volúmenes: 7,5 µL de master mix, 0,5 µL de cada primer (10 µM) 5,5 µL H₂O y 1 µL de ADN (20 ng). Se emplearon primers polF TGCGAYCCSAARGCBGACTC y polr ATSGCCATCATYTCCCGGA para fijación de nitrógeno (Orr et al 2018); y pqqEf GARCTGACYTAYCGCTGYCC y pqqEr TSAGSAKRARGCCTGRCA para solubilización de fosfato (11). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador SimpliAmp (Thermo Scientific). En la amplificación de los dos marcadores se usó un Tm de 55,2 °C y un tiempo de extensión de 1 minuto 30 segundos, por 30 ciclos. Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 0,8%.

RESULTADOS

Respiración basal del suelo

Se obtuvo como resultado la producción de CO_2 en las tres muestras de suelo, encontrando una ligera diferencia en dicha producción. Con respecto al suelo de bosque primario, se observó mayor capacidad de producción de CO_2 y el suelo intervenido, presentó menor producción. Es importante resaltar el incremento de CO_2 el día 24, ya que se les adicionó 1 mL de glucosa al 1 mM. El suelo de bosque secundario en los primeros días tuvo una actividad semejante a la del suelo natural y a partir del día 14 la producción de CO_2 fue menor.

La tasa de respiración basal del suelo natural, fue en aumento, al pasar el tiempo, además se observó un incremento notable en el cuarto día de incubación con un pico elevado de producción de CO_2 . No obstante, se pudo evidenciar un descenso de CO_2 en el día 15 de incubación, hasta el día 24, cuando se adicionó glucosa al 1mM que se realizó (Figura 1).

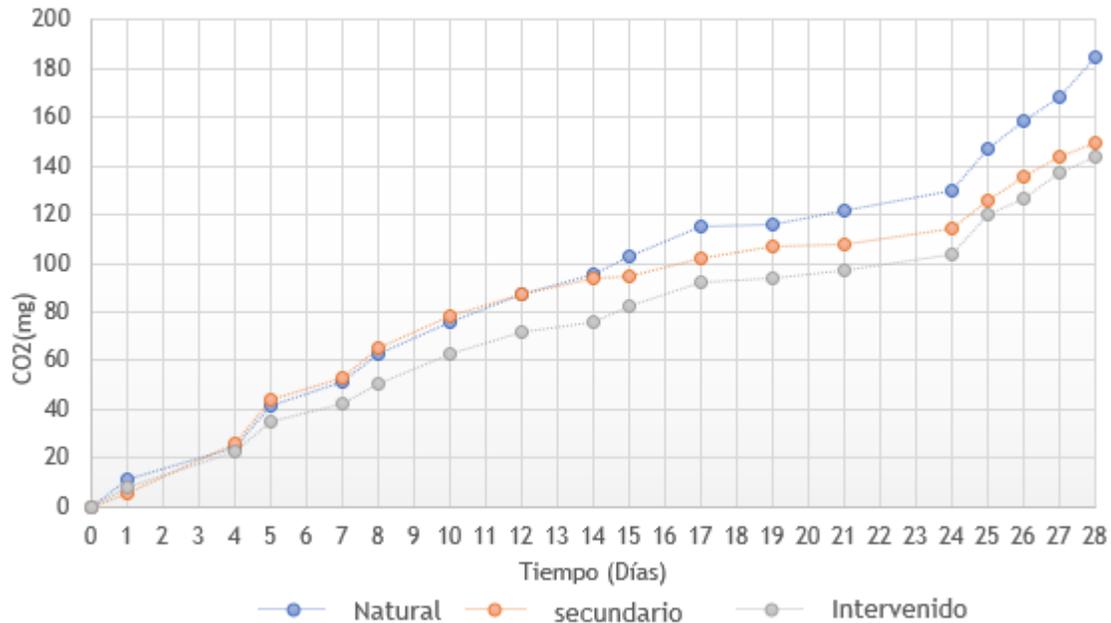


Figura 1. Seguimiento de la actividad enzimática en relación a la emisión de CO_2

Análisis fisicoquímico

Para el análisis fisicoquímico se consiguió determinar las características físico-químicas de cada uno de los suelos analizados con ayuda del kit LaMotte (Tabla1). Lo que indica que el suelo del bosque secundario posee un pH alcalino, mientras que el suelo del bosque intervenido como el natural presentaron pHs moderadamente ácidos, debido al uso excesivo de este en las diferentes actividades antrópicas.

Tablas 1. Caracterización física y química de los suelos estudiados.

Parámetros fisicoquímicos	Natural (Kg/ha)	Secundario (Kg/ha)	Intervenido (Kg/ha)
PH	6,8	8,0	5,8
Nitrato	11,2	11,2	168,1
Fosforo (P) ($P \times 2.3 = P_2O_5$)	28	84	112
Potasio	-336,2	-118,8	101,7
Aluminio	12,5	12,5	12,5
Nitrógeno / Amonio	12,5	12,5	12,5
Calcio	3500	3500	3500
Cloro	1250	500	1250
Hierro férrico	5,6	16,8	5,6
Humus	Very Low	Medium	Very Low
Magnesio	12,5	12,5	12,5
Manganeso	12,5	30	12,5
Nitrito	2,5	2,5	12,5
Sulfato	5000	125	5000

Aislamiento y diversidad de bacterias del suelo

El aislamiento y recuperación de bacterias del suelo se realizó en medio nutritivo para determinar la abundancia total y en medio Ashby para determinar la abundancia de fijadores de nitrógeno. En cada tipo de suelo muestreado se obtuvo un porcentaje de recuperación diferente, siendo el suelo intervenido el que presento mayor carga microbiana y el suelo de bosque secundario el de menor carga (Tabla 2). En total se observaron seis colonias diferentes con capacidad para fijar el nitrógeno aeróbicamente, en donde el mayor número de cepas aisladas se presentó en el bosque intervenido.

Tabla 2. Abundancia y diversidad de suelos del BST

	AN			ASHBY		
	BN	Bsec	BI	BN	Bsec	BI
Abundancia (UFC/mg)	26	23	42	18	15	19
Diversidad (colonias diferentes)	2	3	2	1	2	3

Nota: (Bsec) bosque secundario, (BN) bosque natural, (BI) bosque intervenido.

Caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno

Los seis aislados fijadores de nitrógeno, presentaron diferentes morfologías de colonias (Tabla 3). Sin embargo, dos tipos de aislado presentaban coloración crema brillante con variaciones de forma; y los otros cuatro tipos eran translucidos y mucoide. Por otro lado, al hacer las observaciones microscópicas se determinó que dos aislados son Gram positivos y cuatro Gram negativos (Figura 1).

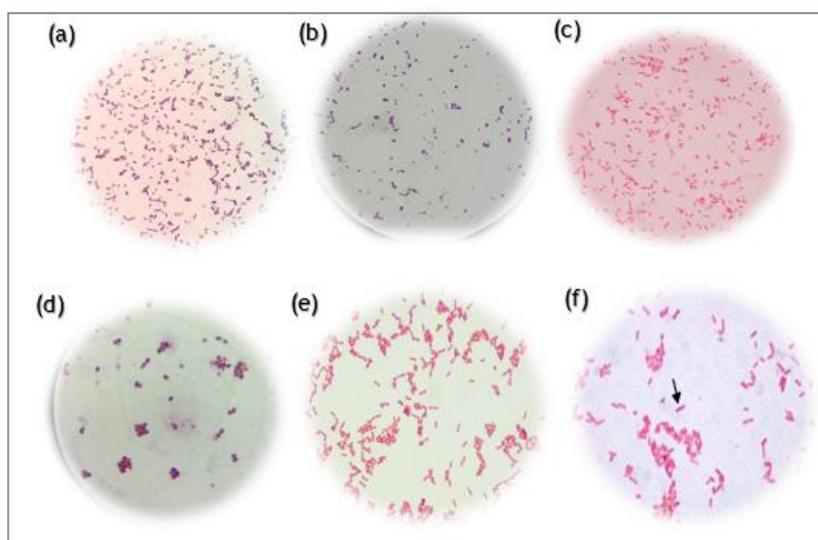


Figura 2. Observación microscópica de los aislados fijadores de nitrógeno; (a) NSI2, (b) NSI1, (c) NSI3, (d) NNI3, (e) NNI4 (f) NSL1.

Tablas 3. Descripción macroscópica de los 6 aislados en medio Ashby.

Código	Tipo de suelo	Descripción de la morfología macroscópica	Descripción microscópica
NSI1	Intervenido	Colonias convexas, brillantes, transparentes, irregulares, rugosas y mucoide.	Cocos Gram positivos
NSI2	Intervenido	Colonias elevadas, transparentes, brillantes, mucoide.	Bacilos Gram negativos
NSI3	Intervenido	Colonias convexas, brillantes, de color blanco, circular, entera y puntiformes.	Bacilos Gram negativos
NNI3	Secundario	Colonias elevadas, irregulares, enteras, brillantes, transparente, lisa y mucoide.	Cocos en racimo Gram positivos
NNI4	Secundario	Colonias convexas, enteras, cremosas, lisas, brillantes, puntiformes y de color rosa claro.	Bacilos Gram negativos
NSL1	Natural	Colonias elevadas, irregulares, brillantes, lisas, mucoide y de color verde fluorescente.	Bacilos cortos Gram negativos

Por otro lado, en ninguno de los aislados se observó lisis de glóbulos rojos en el medio agar sangre (gamma hemólisis), por lo tanto, poseen poco riesgo de ser patógenos (Tabla 4).

Tablas 4. Descripción de la hemolisis y morfología de los 6 aislados en medio agar sangre.

Código	Tipo de suelo	Número de la dilución sembrada	Tipo de hemolisis	Descripción de la morfología macroscópica
NSI1	Intervenido	10 ¹	Gama hemolisis	colonias blancas, cremosas, circular, convexa, brillantes y lisas
NSI2	Intervenido	10 ²	Gama hemolisis	Colonias cremosas, convexas, color blanco, circular, redondas, brillantes y lisas
NSI3	Intervenido	10 ³	Gama hemolisis	Colonias cremosas, convexas, irregular, ondulada, brillantes, rugosas y de color amarillo opaco
NNI3	secundario	10 ³	Gama hemolisis	Colonias secas, opacas, elevadas, puntiformes, rugosas y de color amarillo claro
NNI4	secundario	10 ⁴	Gama hemolisis	Colonia opaca, elevada, rugosa, puntiforme, redonda, secas y de color rosado
NSL1	Natural	10 ¹	Gama hemolisis	Colonias planas, irregulares, onduladas, rugosas, secas y de color blanco, crecimiento a las 48h

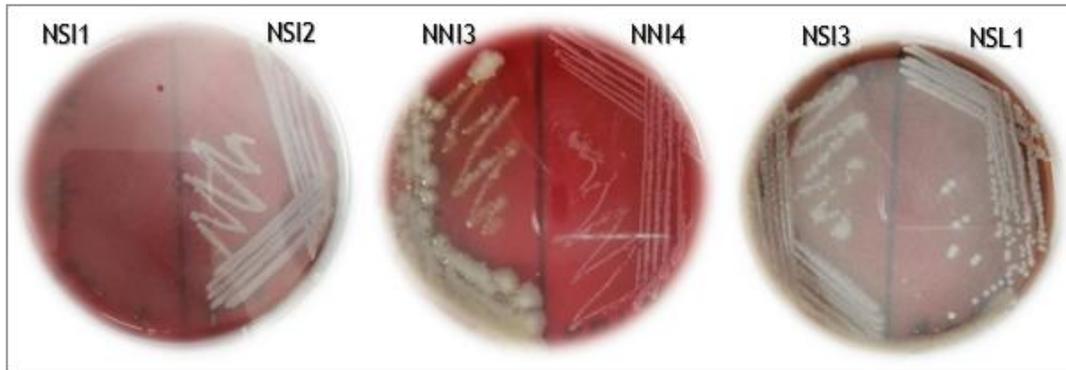


Figura 3. Caracterización macroscópica de los 6 aislados en medio agar sangre para identificar la actividad hemolítica, (NS1) no se evidencio crecimiento a las 24h.

Determinación de la actividad metabólica

Se observó crecimiento después de las 24 horas de incubación, diferenciando tres colonias con capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fosfato al mismo tiempo (Figura 4).

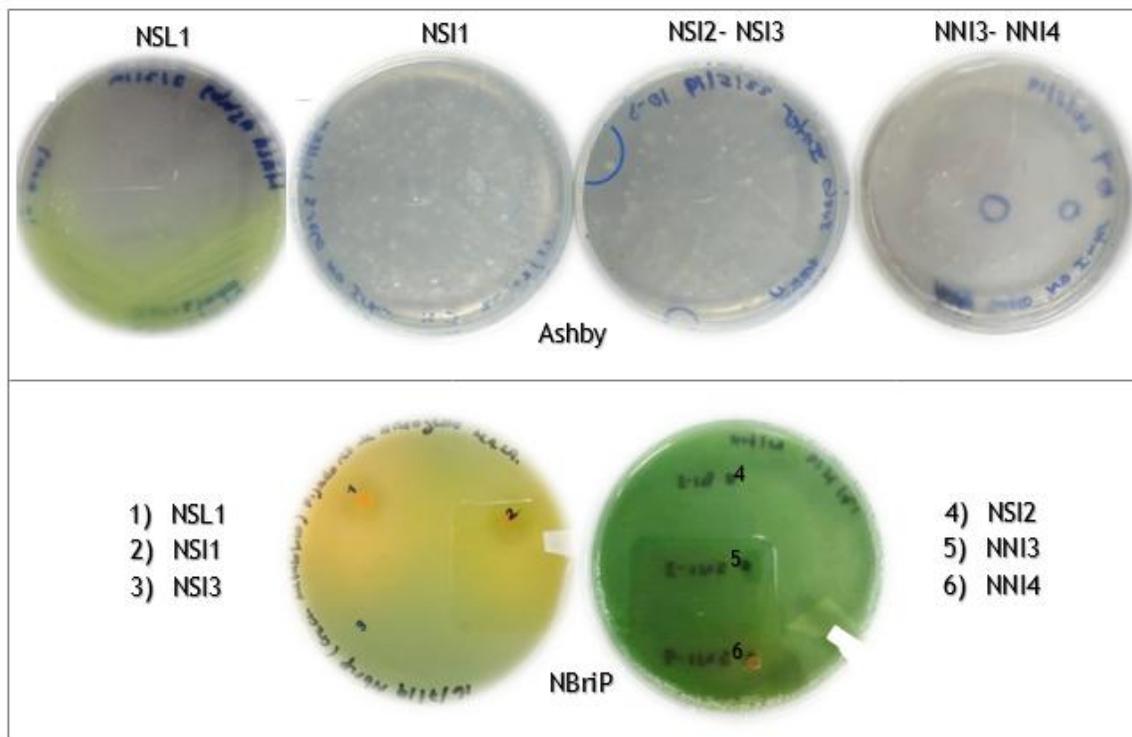


Figura 4. Caracterización metabólica de los aislados en medio Ashby y NBriP.

Verificación molecular de actividad promotora de crecimiento

El protocolo de extracción permitió obtener un ADN íntegro a partir de las muestras de los 6 aislados bacterianos, sin signos de degradación o fragmentación (Figura 5). Además, para realizar la prueba molecular se seleccionaron los aislados NL1 y NNI se realizó la amplificación de *NifH* y *PQQE*. Como resultado se obtuvo la amplificación de ambos marcadores en los dos aislados (Figura 6). Indicando que efectivamente poseen la maquinaria genética para realizar este metabolismo.

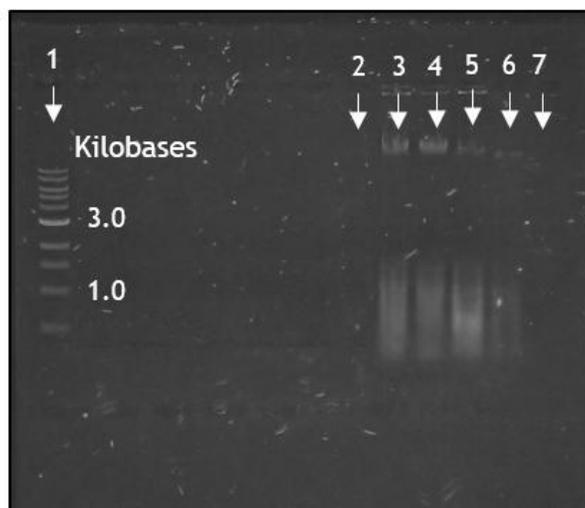


Figura 5. ADN genómico en electroforesis en gel de agarosa al 08%; (1) escalera de peso molecular, (2) NSI1, (3) NSL1, (4) NSI2, (5) NNI3, (6) NSI3, (7) NNI4.

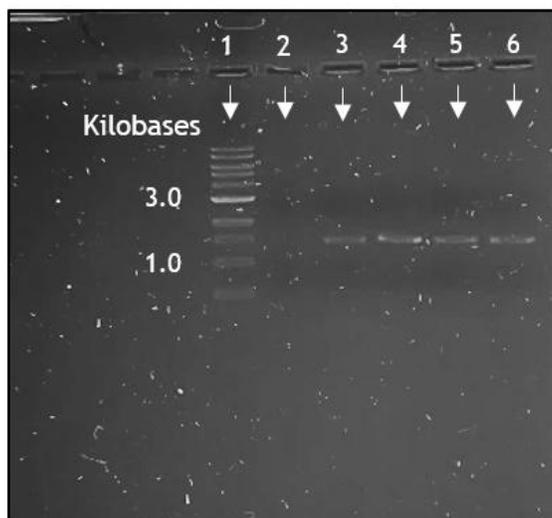


Figura 6. Amplificación de genes de fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% 80v por 380min; (1) escalera de peso molecular, (2) control negativo, (3) NSL1, (4) NNL3, (5) NSL1, (6) NNL3.

DISCUSIÓN

Los suelos del bosque seco tropical son de gran importancia en nuestro país, ya que son fuente de materias primas para el comercio y la alimentación (16). Los suelos poseen bacterias que cumplen con diversas funciones benéficas como, la fijación del nitrógeno molecular, la producción de fitohormonas, la eliminación de compuestos tóxicos y mantener el equilibrio ambiental y ecológico en el agroecosistemas. Este tipo de bacterias son utilizadas como biofertilizantes para disminuir el uso de compuestos nitrogenados sintéticos, además de generar mayor rentabilidad desde el punto de vista económico e incluso resiliencia en el mismo suelo del BST (17-19).

En los suelos evaluados se observó que la diversidad fue mayor en suelos intervenidos que en suelos naturales de BST. Esto está relacionado a los suelos intervenidos y secundarios que han sido usados para actividades agropecuarias típicas de la región, es decir suelos con vocación agrícola. La mayoría, cultivos de hortalizas que fueron fertilizados con gran cantidad de materia orgánica y fosfato, alterando las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo. Sin embargo, en el suelo del bosque intervenido se desconoce con precisión el tipo y la cantidad de fertilizantes nitrogenados sintéticos que puedan inhibir las bacterias de este tipo (20).

Se compararon los tres tipos de suelo a través de la respiración basal del suelo y las características fisicoquímicas. La mayor actividad biológica del suelo fue la del bosque natural y la menor actividad enzimática en el intervenido. Esto se debe a que el suelo del bosque natural, posee en si una mayor diversidad de bacterias cultivables y no cultivables (21). En el análisis fisicoquímico, se evidenció un color oscuro en el suelo de bosque natural y secundario, lo que hace suponer la existencia de gran cantidad de materia orgánica presente. Se observó que todos los suelos colectados, tuvieron pH muy cercanos a la neutralidad, lo que favorece al aislamiento de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno. Sin embargo, el suelo intervenido presentó un Ph ligeramente ácido de pH 5,8 lo que posiblemente afectó la recuperación y el crecimiento de bacterias de este tipo; como lo demuestran estudios que reportan especies fijadoras de nitrógeno que pueden crecer en pH 5,5 (22). No obstante, el rango óptimo para el crecimiento de estas bacterias se encuentra entre 7,0 y 7,5 (23).

Para el aislamiento y recuperación de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno, se usó el medio Ashby, este es un medio diferencial libre de nitrógeno que permite el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. En los tres tipos de suelo del BST, se logró detectar seis aislados con capacidad para fijar el nitrógeno, con diferentes morfologías microscópicas, Gram positivas y Gram negativas, predominado principalmente las Gram negativas (Figura 1). Las seis cepas aisladas, presentaron diferentes morfologías de colonia, predominando dos tipos: unas de ellas (NNI4 y NSI3) se caracterizaban por ser colonias de color crema, medianas, irregulares y brillantes, morfologías típicas reportadas para bacterias del género *Azotobacter* (24). Y los aislados SL1, NSI2, NNI3 y NSI1 presentaron colonias pequeñas translucidas y brillantes, las cuales son muy similares a especies del género *Beijerinckia* (25). De estos seis aislados solo NNI4 y NSI3 presentaron capacidad de solubilizar fosfato además de fijar nitrógeno. Tomando en cuenta las semejanzas morfológicas y metabólicas es importante que en el futuro se haga una caracterización e identificación de estos aislados.

Con respecto a la caracterización morfológica o a la producción de pigmentos en un medio Ashby, se evidenciaron tres pigmentos diferentes, rosa claro, blanco y verde fluorescente. Según se ha reportado, el género *Azotobacter* tiene la capacidad de producir pigmentos solubles, lo que puede ser útil a la hora de caracterizar diferentes especies (26). Asimismo, de acuerdo con la composición del medio, otras especies como *Beijerinckia derxi* tienen la capacidad de presentar pigmentaciones solubles de color verde (27). Los resultados muestran que los aislados NSI3 y NSL1 presentaron características fenotípicas y de pigmentación similares a *A. chroococcum*; este tipo de pigmentación se debe a que el benzoato es tomado como fuente de carbono y metabolizado por medio de la vía β -ceto adipato, que genera succinato que, a su vez, es introducido a la cadena respiratoria mediante el sistema dependiente de flavina, el cual está relacionado con la pigmentación del medio (28). Por otro lado, se observó que el aislado NNI4 es un bacilo Gram negativo, y posee una pigmentación de color rosa claro, diferentes a los de *Azotobacter*; esto indica que puede ser fijadora de nitrógeno que pigmenta pero que no de este género (29). A pesar de las diferencias fenotípicas observadas, estas características no son suficientes para identificar las bacterias, por lo que es necesario realizar análisis moleculares, que permita determinar el género y la especie de cada una de las cepas aisladas.

Para realizar los análisis moleculares se procedió a extraer ADN total de los aislados. En esta etapa se utilizó un solo protocolo de extracción de ADN genómico, el cual utiliza solventes orgánicos para la remoción de proteínas y polisacáridos, agentes que pueden inhibir la reacción de PCR (30). Todos los aislados presentaron una extracción de ADN exitosa, sin contaminante o presencia de proteínas o ARN. Además, se realizó la amplificación del ADN con 16S para verificar la calidad del ADN. Este amplificado no pudo ser usado para hacer identificación molecular debido a que se obtuvieron amplificaciones inespecíficas a pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios sería poco estable y la polimerasa no podrá iniciar la síntesis (31). A partir de este ADN se logró identificar genes relacionados al metabolismo de fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato. Esta prueba permite constatar cuál es la ruta metabólica empleada en estas actividades (32).

CONCLUSIONES

Actualmente no existen inoculantes biológicos nativos de la región Caribe que permitan la recuperación de ecosistemas y el desarrollo de una agricultura sostenible. Por esto, la identificación de bacterias nativas promotoras de crecimiento vegetal, es un aporte importante para el futuro desarrollo de biofertilizantes adaptados a la región Caribe, que puedan ser empleados en recuperación y restauración del bosque, así como en la agricultura tradicional. Además, teniendo en cuenta que en Colombia existen pocos estudios realizados con relación a microorganismos del BST. El presente trabajo, forma una línea base para la caracterización microbiológica de este ecosistema en la región.

Asimismo, hay que tomar en cuenta que solo se aislaron bacterias cultivables, entre ellas algunas fijadoras y solubilizadoras de fosfato, por lo que el aumento de la actividad enzimática del bosque natural frente a una baja diversidad, puede estar relacionado con aquellos microorganismos especialistas que no eran cultivables. De igual forma, el porcentaje de recuperación del suelo intervenido, está relacionado con la forma como fue tratado el suelo y a su empleo en la agricultura, por lo cual el número de bacterias

con capacidad para fijar nitrógeno fue mayor. Todo esto muestra que al alterar el bosque también se modifican la estructura de las comunidades microbianas del suelo. Finalmente, es necesario realizar estudios complementarios que permitan estimar la cantidad total de microorganismos del suelo del BST y sus funciones en el ecosistema.

REFERENCIAS

1. Cesar R. La transformación del bosque seco desde la mirada geográfico -ambiental, en la cuenca hidrográfica del río cesar . 2017.
2. Linares JR. Por Jorge Ruiz Linares 1 {&} Mar ía Claudia Fandiño Orozco 2. Acad Colomb Ciencias. 2009;5-16.
3. Estado Ded, En R. Vegetation And Soil Properties In Two Tropical Dry Forests. 1998;
4. Colombia tropendos international. Aspectos ecologicos del bosque seco tropical. 2016. 62 p.
5. González-m R, Isaacs P. El bosque seco tropical en Colombia. 2014;1-29.
6. Villanueva B, Melo O. State of knowledge and contributions to the vascular flora of dry forest of Tolima. Colomb For. 2015.
7. Nacionales Lp. B Iota Colombiana de Colombia. Biota Colomb. 2007;8 (2)(0124-5376):221-39.
8. Jesús Ballesteros, Katia Reyes JR. *Bradypus variegatus* En Fragmento De Bosque. Mvz Córdoba. 2009;14(3):1812-9.
9. Balvanera P. Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. Ecosistemas. 2012;21(1-2):136-47.
10. Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., Mena-Martínez, M.E. 2008. A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. Mol Biotechnol. 40:13-17.
11. Carlos A Cisneros R , Marina Sánchez de P JCMF. Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en un Andisol de la región cafetera colombiana Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region. 2017;(1):21-8.
12. Orr CH, James A, Leifert C, Julia M, Cummings SP, Orr CH, et al. Diversity and Activity of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria and Total Bacteria in Organic and Conventionally Managed Soils Diversity and Activity of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria and Total Bacteria in Organic and Conventionally Managed Soils □ †. 2011;19.
13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, editor. Mol Biol Evol. 2018 Jun;35(6):1547-9.
14. Jiménez, A. 1996. Aislamiento y caracterización de diazotróficos microaerofílicos presentes en suelos rizósferico y raíces de Cedrela montaña. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 113 p.
15. Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., & Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting *rhizobacteria* allow reduced application rates of chemical fertilizers. Microbial Ecology, 58(4), 921-929. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>.

16. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
17. Aquilanti L., Favilli F & Clemeti F. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol 36. Pp 1475-1483.
18. Pérez Lavallo, L., Bolívar Anillo, H., & Díaz Pérez, A. (2016). Biofertilizantes en Colombia. In Estrada-López, H., Saumett, H., Iglesias, M. (Eds.). *Productos de confitería nutracéutica y biofertilizantes: Una opción empresarial para cultivadores de frutas y hortalizas* (179-222). Barranquilla, Universidad Simón Bolívar.
19. Perez, L., Estrada, H., Serrano, M., Benitez, M., Aranguren, Y.(n.d.). Efecto de la aplicación de inoculantes biológicos sobre el desarrollo de las plantas de *Capsicum* sp. 1st ed. Barranquilla- Atlántico: Ciencia y Tecnología Agropecuaria, p.16.
20. 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.
21. Atlas R. & Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Cuarta edición. Pearson educación. Madrid. Pp 413-417.
22. Balandreau J. 1986. Ecological factors and adaptive processes in N₂-fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant and Soil*. Vol 90. Pp 73.
23. NOGALES B. 2005. *Microbiología del suelo en la era de la biología: Ecosistemas*. Vol 2. Pp 1-10.
24. García M., Farias R., Peña J. & Sanchez J. 2005. Inoculation of Wheat var. Pavon with *Azospirillum* spp. and *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana* Vol 23 No 1. Pp 65-72
25. Garzon S., Lamprea S & Martinez M. 2001. Desarrollo de una preparación líquida de *Azotobacter* utilizando como medio de cultivo los subproductos de la industria sucroquímica. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 25.
26. Dedysh S., Ricke P. & Liesack W. 2004. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology*. Vol 150. Pp 1301-1313.
27. Drummond M., Walmsley J. & Kennedy C. 1995. Expression from the nifB Promoter of *Azotobacter vinelandii* can be activated by NifA, VnfA, or AnfA Transcriptional Activators. *Journal of Bacteriology*. Vol. 178 No. 3. Pp 788-792
28. Garg S., Bhatnagar A., Kalla A. & Narula N. 2001. In vitro nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresearch Technology*. Vol 80. Pp 101-109.
29. Eady R., Richardson H., Miller R., Hawkins M. & Lowe D. 1988. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: purification and properties of the Fe protein. *Biochemical Journal*. Vol 256. Pp 189-196.
30. Nagpal P., Jafri S., Readdy M. & Das H. 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Vol 171. Pp 3133-3138.
31. Kurabachew M., Engerd O., Sandaa R., Lemma E. & BJORVOTN B. 2003. Amplified ribosomal DNA restriction analysis in the differentiation of related species of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 55. Pp 83- 90.
32. Escobar M. 2002. *Fundamentos de microbiología*. Tercera edición. Centro editorial Javeriano. Pp 223.