

UNIVERSIDAD PONTIFICIA CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Determinación de las condiciones para producción de mucopolisacáridos por aislados de *Azotobacter* provenientes de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos de la región amazónica.

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

GALO NICOLÁS MOLINA SOLIS

Quito, 2020

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Galo Molina y Adriana Solis por el incondicional apoyo a lo largo del tiempo de duración de la carrera, disertación también por formación personal y profesional hasta la actualidad.

A mi tía Martha Molina por el apoyo incondicional y a mis hermanos por acompañarme durante el tiempo de formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por siempre ser un ejemplo para seguir y un apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria.

A Amazonía viva de Petroamazonas EP, en colaboración con la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por permitir esta investigación.

Adicionalmente un agradecimiento especial Mtr. Verónica Luna por ser mi directora de disertación y a la confianza que depositó en mí para llevar a cabo la investigación.

A mis compañeros de tesis: Jacqueline González y Katherine Zaldumbide, por el apoyo y consejo en momentos fáciles y difíciles.

Un agradecimiento también a Bolívar Salas y a la sala de preparaciones del Edificio de Ciencias Biológicas, que nos brindó siempre ayuda y un espacio para llevar a cabo la investigación.

Un especial agradecimiento a investigadores que apoyaron esta tesis como Claudia Terán, Cristiana Katty, Nicole Coronel, Carolina Portero, Diana Astorga, Magaly Estrella, Fernando Santacruz, Sebastián Aguilar y Diego Mena.

Finalmente, agradecer a los docentes y compañeros que me acompañaron a lo largo de la carrera universitaria, por sus enseñanzas y buen trato, lo que me ayudó a convertirme en un excelente profesional del Ecuador.

Infinitas gracias.

Tabla de contenido

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	88
3. INTRODUCCIÓN	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Área de muestreo de <i>Azotobacter</i> spp.	12
4.2. Aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp. de muestras de suelo.	13
4.3. Identificación de cepas de <i>Azotobacter</i> spp.	13
4.4. Identificación molecular de los aislados.	14
4.5. Preservación de las cepas aisladas de <i>Azotobacter</i> spp.	15
4.6. Evaluación de la producción de EPS.	15
4.6.1. Evaluación de producción de EPS con distintas fuentes de carbono.	15
4.6.2. Evaluación de producción de EPS frente a diferentes concentraciones sales de magnesio.	16
4.6.3. Evaluación de producción de EPS en diferentes concentraciones de nitrógeno.	16
4.7. Extracción de mucopolisacáridos de cepas de <i>Azotobacter</i> spp.	16
4.8. Cuantificación de los exopolisacáridos (EPS).	17
5. RESULTADOS	17
5.1. Aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp. de muestras de suelo.	17
5.2. Identificación fenotípica de <i>Azotobacter</i> spp.	18
5.3. Identificación mediante API 20 NE.	18
5.4. Caracterización molecular.	19
5.5. Evaluación de la producción de exopolisacáridos:	19
5.5.1. Fuentes de carbono.	19
5.5.2. Concentración de sales de magnesio.	20
5.5.3. Concentración de nitrógeno.	20
6. DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES	26
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Identificación fenotípica por pruebas API	17
Figura 2. Bandas obtenidas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%	18
Figura 3. Producción de EPS en diferentes fuentes de carbono.....	19
Figura 4. Producción de EPS en diferentes concentraciones de magnesio	20
Figura 5. Producción de EPS en diferentes concentraciones de nitrógeno.....	20

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Codificación de las cepas y lugares de muestreo	13
Tabla 2. Pruebas bioquímicas de identificación.....	16
Tabla 3. Identificación molecular de las cepas en base a la comparación en el programa BLAST.....	17

Determinación de las condiciones para producción de mucopolisacáridos por aislados de *Azotobacter* provenientes de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos de la región amazónica.

Determination of the conditions for the production of mucopolysaccharides by *Azotobacter* strains isolated from clay soils contaminated with hydrocarbons of the amazon region.

Nicolás Molina¹ y Verónica Luna¹

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador
e-mail: nicolasmolina303@gmail.com

1. RESUMEN

La Amazonía Ecuatoriana es la región más afectada por derrames de petróleo, siendo los suelos arcillosos uno de los más comprometidos. Los derrames en suelos arcillosos son un grave problema, debido a que se compacta y limita la aireación, dificultando su biorremediación. Debido a esta problemática, en el presente trabajo se estudió *Azotobacter* spp., una bacteria del suelo que produce compuestos extracelulares, que incrementan la porosidad y estructura del suelo, aisladas de suelos contaminados por hidrocarburos o en proceso de biorremediación. Se obtuvieron cuatro aislados: tres identificados como *Azotobacter chroococcum* y uno como *Azotobacter vinelandii*. Se determinaron las condiciones nutricionales que favorecen la producción de exopolisacáridos (EPS). Al evaluar la fuente de carbono, se determinó que la melaza y la sacarosa favorecen la producción de EPS. En cuanto a las sales de magnesio y nitrógeno, depende del aislado. Estos resultados corroboran el potencial uso de esta bacteria cultivada en condiciones específicas para la agregación del suelo.

Palabras clave: *Azotobacter*, biorremediación, exopolisacáridos, estructura del suelo, sulfato de magnesio.

2. ABSTRACT

The Ecuadorian Amazon is the most affected region by oil spills, with clay soils being one of the most affected. The spills in clayey soils are a serious problem, because it is compacted and limits the aeration, making difficult its bioremediation. Due to this problem, in this work *Azotobacter* spp., a soil bacterium that produces extracellular compounds, which increase the porosity and structure of the soil, isolated from soils contaminated by hydrocarbons or soils in process of bioremediation, was studied. Four isolates were obtained: three identified as *Azotobacter chroococcum* and the fourth as *Azotobacter vinelandii*. The nutritional conditions that enhance the production of exopolysaccharides (EPS) were determined. When evaluating the carbon source, it was determined that molasses and sucrose favor the production of EPS. And for magnesium and nitrogen salts, it depends on the isolate. These results corroborate the potential use of this bacteria grown under specific conditions, of soil inoculation for aggregation.

Key words: *Azotobacter*, bioremediation, exopolysaccharides, magnesium sulphate, porosity.

3. INTRODUCCIÓN

Los derrames de hidrocarburos en zonas de explotación petrolera son comunes en Ecuador, siendo la Amazonía la región más afectada (Ponce 2014; Berrú et al. 2017). Estos derrames datan mayormente de 1972 a 1992, y se estima que se han descargado 17 000 millones de galones de petróleo y 30 000 millones de galones de hidrocarburos tóxicos en el suelo y en flujos de agua de la región amazónica (Navarrete et al. 2013). Los derrames de hidrocarburos repercuten en la salud humana, el medio ambiente y las propiedades fisicoquímicas del suelo (Anza et al. 2016; Monsalve 2017). Además, afectan principalmente la estructura del suelo, siendo un desafío especial remediar suelos arcillosos que, ante la presencia de hidrocarburos,

aumentan su capacidad de compresión, disminuyen su sistema de drenado (Martínez et al. 2016; Monsalve 2017), lo que a su vez interfiere con la disponibilidad de nutrientes y limita el desarrollo de la microbiota del suelo (Gámez et al. 2017). Justamente, este tipo de suelos son los que prevalecen en la Amazonía Ecuatoriana por lo que hay que aplicar técnicas de manejo de suelo para incrementar la cantidad de materia orgánica y de esta forma mejorar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de los suelos arcillosos (Ponce 2014), incluida la capacidad de absorción de líquidos y la asimilación de nutrientes de manera que se facilite la biorremediación (Núñez 2001, Das y Chandran 2011).

Una de las técnicas *ex situ* más utilizadas para la remediación de suelos contaminados con carburantes son las biopilas, en donde los microorganismos degradan y mineralizan los compuestos carbonados, reduciendo las concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en el suelo (Lara y Vega 2017). No obstante, en el caso de suelos arcillosos, la actividad biológica en las biopilas se encuentra limitada debido a una aireación deficiente y la compactación. Por ende, para aumentar la eficiencia de este tratamiento es necesario mejorar la estructura de esos suelos (Thompson y Troeh 1988).

La compactación de los suelos arcillosos se soluciona principalmente a través de procesos físicos o químicos. Los procesos físicos mejoran la estructura del suelo al formar canales de aire (Hernández et al. 2008). El aire fomenta la actividad de los microorganismos del suelo, aunque la aireación puede causar endurecimiento en las capas profundas de este, si no se calcula el volumen de aire que se suministra al suelo (Aldas 2014). El volteo mecánico a través de maquinaria pesada también promueve la aireación, no obstante, estos procesos son costosos y requieren personal altamente capacitado (Navarro 2018).

Una alternativa para evitar la compactación y mejorar la permeabilidad del suelo es el uso de bacterias productoras de mucopolisacáridos (Gámez et al. 2017) las cuales actúan como

cementantes de las partículas de suelo para formar agregados. Los exopolisacáridos son largas cadenas lineales de azúcares complejos sintetizados por varios microorganismos, entre los cuales destacan, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Citrobacter* y *Rhizobium* (Mathews et al. 2013). El presente estudio se realizó como una colaboración entre Petroamazonas EP y la PUCE y se enfoca en la utilización de *Azotobacter* para mejorar la estructura de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos, gracias a su capacidad de producción de exopolisacáridos (EPS) (Reginawanti et al. 2017). Además, se ha reportado que este género bacteriano tiene la capacidad de modificar hidrocarburos policíclicos y transformarlos en bioelementos primarios como nitrógeno, fósforo, azufre y carbono (Meza et al. 2016).

La producción de EPS en *Azotobacter* spp. es abundante, siendo los alginatos, polihidroxibutiratos (pululanos y beijerinkanos), también una amplia variedad de fitohormonas entre las cuales se encuentra el ácido indolacético, útil para crecimiento de plantas en sitios con alto índice de contaminación (Castillo 2017). Estas moléculas favorecen el desarrollo de macroporos, incrementan la velocidad de infiltración, la permeabilidad, la aireación, reducen la plasticidad y la compactación del suelo (Thompson y Troeh 1988; Núñez 2001) y sirven como mecanismo de defensa para evitar la intoxicación por hidrocarburos o metales pesados (Reginawanti et al. 2017). Además, se ha comprobado la capacidad de *Azotobacter* spp. de formar mucopolisacáridos en condiciones *in vitro*, bajo diferentes condiciones controladas de cultivo en un laboratorio (fuentes de carbono, pH, humedad, sales de magnesio y concentración de nitrógeno) (Mata 2006; Escobar et al. 2011; Quezada 2012). También es capaz de producirlos en condiciones *in vivo*, bajo condiciones adversas de crecimiento (Vu et al. 2009). Por lo tanto, se considera la posibilidad de que *Azotobacter* spp. aislado de biopilas o zonas contaminadas de suelo arcilloso sea capaz de modificar la estructura del suelo por su capacidad de producir EPS (Quezada 2012). La inoculación de *Azotobacter* spp. es una alternativa viable

e innovadora, por su bajo costo de producción y su potencial para mejorar la estructura de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos en el Ecuador (Molina et al. 2009).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de muestreo de *Azotobacter* spp.- Para el aislamiento de *Azotobacter* spp. se tomaron muestras de suelo hasta 10 cm de profundidad (Thompson y Troeh 1998), tanto en biopilas en proceso de biorremediación como en suelos contaminados con hidrocarburos. Se recolectaron al menos 15 submuestras en diferentes puntos de cada biopila o suelo contaminado para formar una muestra compuesta, que fue homogenizada en un balde con la ayuda de una pala (Carter y Gregorich 2007; Mau et al. 2012). Se transportaron aproximadamente 500 g de suelo a 4°C en oscuridad para ser analizados en el laboratorio de Microbiología PUCE campus Nayón.

4.2. Aislamiento de *Azotobacter* spp. de muestras de suelo.- Para el aislamiento de *Azotobacter* spp., se utilizó el método de gránulos de suelo (Jiménez 2007). Se tomaron 10 a 20 gránulos de un tamaño aproximado de 2mm de diámetro, y se depositaron en la superficie del agar Ashby, distribuidos de forma homogénea. Estas cajas Petri se incubaron durante 2-3 días a 28°C. Las colonias sospechosas de pertenecer a este género bacteriano se reaislaron en otra caja de agar Ashby (Jiménez 2007).

4.3. Identificación de aislados de *Azotobacter* spp.- Se seleccionaron colonias grandes viscosas, blanquecinas o levemente amarillentas, a las que se les realizó una tinción Gram (Thaweenut et al. 2011). Se realizó la identificación fenotípica mediante las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, hidrólisis de almidón, utilización de glucosa, maltosa, manitol y prueba de desnitrificación (Escobar et al. 2011). Además, se complementó la identificación fenotípica mediante la galería API 20NE, siguiendo las instrucciones del fabricante (Evstatieva et al. 2017).

4.4. Identificación molecular de los aislados. - La extracción de ADN de *Azotobacter* spp. se llevó a cabo mediante el kit AccuPrep Genomic DNA Extraction (K-3032) de BioNEER para bacterias Gram negativas, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La concentración y pureza del ADN fue obtenida por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (Mau et al 2012). El ADN extraído de cada aislado se diluyó hasta alcanzar una concentración de 5 ng/μl.

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tradicional y se utilizaron los *primers* 16S-27 *forward*: 5'-GCTCAAGATTGAACGCTGGCG 3' y el cebador 1655R *reverse*: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC 3'. Posteriormente, se siguió el protocolo determinado por Koohi et al. en 2014, para la PCR donde se modificó la temperatura de *annealing* para mejorar la especificidad, por lo cual, se decidió hacer un gradiente con las siguientes temperaturas 63, 64, 65, 66, 67 y 68°C, mostrando mejores resultados y una sola banda definida al emplear una temperatura de 65°C, detallando el protocolo establecido con una temperatura de denaturación de 94°C por 10 minutos, seguido de temperaturas de 94°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto 30 segundos durante 48 ciclos para la fase de *annealing* y una temperatura de 72°C por 10 minutos para extensión (Koohi et al. 2014).

Los productos obtenidos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 60 minutos a 95 voltios, con su respectiva escalera molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) y controles negativos. Las reacciones de la PCR que mostraron la banda deseada fueron purificadas y secuenciadas mediante el método de Sanger por MacroGen Inc.

Las secuencias obtenidas se limpiaron y alinearon mediante el programa MEGA versión X. Finalmente, las secuencias consenso obtenidas se compararon en la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) mediante la

herramienta informática básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al. 1990; Kumar et al. 2016).

4.5. Preservación de los aislados de *Azotobacter* spp.- Los aislados de *Azotobacter* spp. se crio-preservaron en caldo BHI con 20 % de glicerol a -80°C (Carter y Gregorich 2007).

4.6. Evaluación de la producción de EPS.- Se evaluó la producción de EPS en caldo Ashby-Sacarosa, en tubos con 10 mL de medio, que se incubó a temperatura ambiente durante 60 horas. Para esto, se realizó una suspensión de la bacteria en el medio de cultivo para obtener una turbidez de tubo 0,05 Mc Farland. Luego, se cuantificó la producción de EPS modificando las fuentes de carbono, la concentración de nitrógeno y la concentración de sales de magnesio, siempre trabajando con el caldo Ashby como medio de cultivo base y una solución de 20 g L^{-1} de glucosa como blanco (Moreno et al. 2001; Mata 2006). Cada ensayo se realizó por triplicado.

4.6.1. Evaluación de producción de EPS con distintas fuentes de carbono.- Se evaluó la producción de EPS, reemplazando la sacarosa del medio líquido Ashby con 20 g L^{-1} de manitol o melaza respectivamente como fuentes de carbono y manteniendo las condiciones de cultivo antes mencionadas (Escobar et al. 2011).

4.6.2. Evaluación de producción de EPS frente a diferentes concentraciones sales de magnesio.- Se preparó caldo Ashby-Sacarosa con sulfato de magnesio (MgSO_4) en concentraciones de $0,12\text{ g L}^{-1}$, $0,16\text{ g L}^{-1}$ y $0,2\text{ g L}^{-1}$. En este caldo se inoculó la bacteria y se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo (Mata 2006).

4.6.3. Evaluación de producción de EPS en diferentes concentraciones de nitrógeno.- Se ensayaron diferentes concentraciones de nitrógeno (10 , 15 y 20 g L^{-1} de extracto de levadura) añadidas al caldo Ashby-Sacarosa (medio libre de nitrógeno), manteniendo las condiciones de cultivo antes mencionadas (Escobar et al. 2011).

4.7. Extracción de mucopolisacáridos de aislados de *Azotobacter* spp.- Se empleó la técnica de Jarman et al. (1978). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron los cultivos a 10 000 rpm durante 30 minutos. Al sobrenadante se le añadió etanol al 96%, frío, en proporción 3:1 y se lo almacenó a 4°C durante 12 horas. Se recolectó el precipitado y se centrifugó a 7 000 rpm durante 10 minutos. Se dejó evaporar los residuos de alcohol en el precipitado y se diluyó en agua destilada. Luego, se centrifugó a 20 000 rpm durante 30 minutos para eliminar los residuos de alcohol.

4.8. Cuantificación de los exopolisacáridos (EPS).- Primero, se realizó una curva de calibración de carbohidratos, utilizando glucosa como estándar (Dubois et al 1956). La cuantificación de los exopolisacáridos se llevó a cabo con el método de fenol-ácido sulfúrico desarrollado por Dubois et al. (1956). Se colocó 1 mL de la suspensión de EPS en un tubo de vidrio, al cual se agregó 1 mL de fenol al 5%, se dejó reposar 45 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se le agregó gota a gota 5 mL de H₂SO₄ concentrado, en una campana de extracción. La cuantificación de los EPS se realizó mediante espectrofotometría (espectrofotómetro Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000) con una longitud de onda de 485 nm.

4.9. Análisis Estadístico.- Se llevó a cabo un análisis de varianzas (ANOVA) de una sola vía. Para ello se tomaron en cuenta los supuestos del ANOVA, mediante el test de normalidad (Shapiro-Wilk), homogeneidad de varianzas y pruebas post hoc, para confirmar o rechazar si existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Carter y Gregorich 2007).

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento de *Azotobacter* spp. de muestras de suelo.- Se muestrearon cinco centros de acopio del proyecto de Amazonia Viva, ubicada en La Joya de los Sachas en la provincia de Orellana y cinco suelos con derrames recientes en la región.

A partir de las muestras obtenidas se aislaron seis colonias sospechosas a las que se aplicaron las pruebas de identificación antes mencionadas obteniéndose 4 aislados de *Azotobacter* spp. detalladas en la (Tabla 1).

Tabla 1. Codificación de las cepas y lugares de muestreo.

Código de campo	Código de estudio	Coordenadas de las biopilas	Localización
Centro de acopio CGP-Shushufindi-2	Aztb 001	<u>0°18'S 76°51'O</u>	Joya de los Sachas
Centro de Acopio Shushufindi 1	Aztb 002	<u>0°18'S 76°51'O</u>	Joya de los Sachas
Centro de acopio CGP_landfarming	Aztb 003	<u>0°11'14"S 76°38'42"O</u>	Shushufindi
Suelo con derrame CGP_SHS_RW3	Aztb 004	<u>0°56'S 75°40"O</u>	Yuca

5.2. Identificación fenotípica de *Azotobacter* spp.- Se seleccionaron colonias blancas, transparentes o levemente amarillentas con aspecto mucoide y tamaño de 3 a 5 mm de diámetro. Microscópicamente se observaron bacilos largos, pleomórficos Gram negativos, con presencia de quistes en colonias envejecidas. Los aislados identificados como *Azotobacter* spp. fueron aquellos que presentaron quistes y dieron resultados positivos a las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, hidrólisis de almidón, prueba de desnitrificación y fermentación de glucosa, maltosa y manitol (Tabla 2).

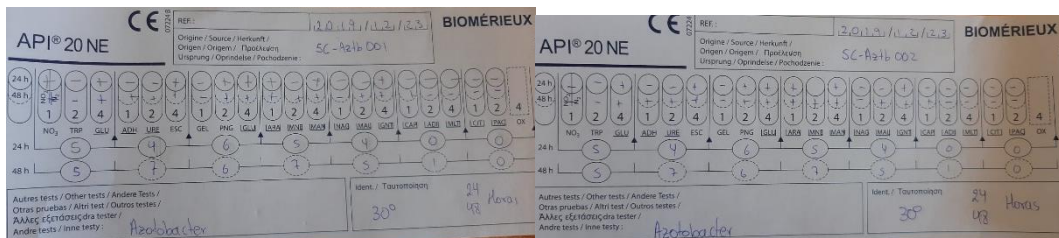
Tabla 2. Pruebas bioquímicas de identificación

Prueba Fenotípica	<i>Aztb 001</i>	<i>Aztb 002</i>	<i>Aztb 003</i>	<i>Aztb 004</i>

Gram	Bacilo G-pleomorfo	Bacilo G-largo	células levaduriformes G-	Bacilo G-corto
Enquistamiento	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón	+	+	+	+
Prueba desnitrificación	+	+	+	+
Asimilación de manitol	+	+	+/-	+
Asimilación de glucosa	+	+/-	+	+
Asimilación de maltosa	+	+/-	+/-	+

+: positivo, -: negativo, +/-: Variable

5.3. Identificación mediante API 20 NE.- Los códigos obtenidos a las 24 horas fueron analizados mediante la base de datos API 20NE (Figura 1).



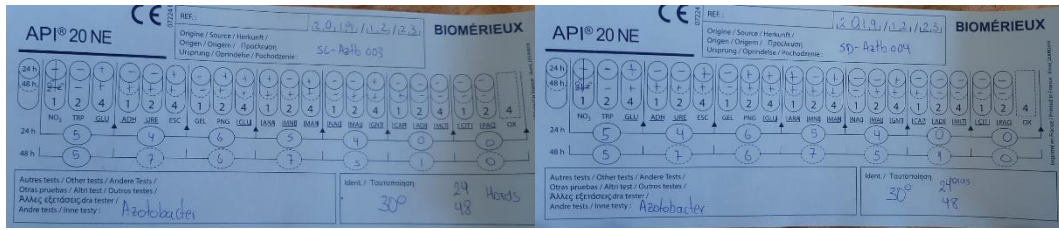


Figura 5. Esquina superior izquierda, API 20 NE para aislado Aztb 001, esquina superior derecha, API 20 NE para aislado Aztb 002, Esquina inferior derecha, API 20 NE para aislado Aztb 003, Esquina inferior derecha, API 20 NE para aislado Aztb 004

5.4. Caracterización molecular. Al realizar la lectura en NanoDrop se obtuvieron concentraciones de 155,6; 1407,6; 68,1 y 57,4 nm/μL; de los aislados Aztb 004, Aztb 001, Aztb 002 y Aztb 003, respectivamente y valores de pureza de 1,82; 1,87; 1,79 y 1,92 respectivamente, que se encuentran dentro del rango permitido (1,80-2,00).

De los 4 aislados se obtuvieron las bandas de un peso molecular de 600 pb (Figura 2).

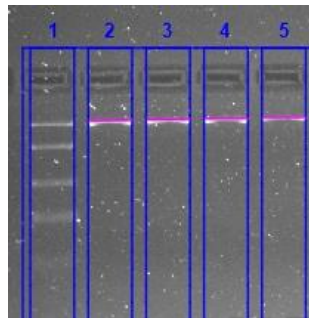


Figura 2. Bandas obtenidas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Las secuencias consenso, de cada uno de los aislados fueron analizadas mediante la herramienta BLAST, las cuales mostraron un porcentaje de identidad de $\geq 99\%$ con la bacteria *Azotobacter chroococcum*, para 3 de los aislados y *Azotobacter vinelandii* para la una (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación molecular de o aislados (programa BLAST).

Código	Número de acceso	Porcentaje de cobertura (%)	E Value	Porcentaje de identidad (%)	Bacteria identificada
--------	------------------	-----------------------------	---------	-----------------------------	-----------------------

Aztb 001	EF100162. 1	100	0.0	99	<i>Azotobacter chroococcus m 001</i>
Aztb 002	EF100162. 1	99	0.0	99	<i>Azotobacter chroococcus m 002</i>
Aztb 003	EF100170. 1	99	0.0	99	<i>Azotobacter chroococcus m 003</i>
Aztb 004	EF100171. 1	100	0.0	99	<i>Azotobacter vinelandii 004</i>

5.5. Evaluación de la producción de exopolisacáridos:

5.5.1. Fuentes de carbono.- Al evaluar tres fuentes de carbono para la producción de EPS, se observó diferencias significativas entre los tratamientos empleados con un valor p de 0,01. Con las tres fuentes de carbono, la cepa *A. chroococcus 001* fue la que produjo mayor cantidad de mucopolisacárido: 168,80 µg/mL con melaza, 153,8 µg/mL con manitol y 147,20 µg/mL con sacarosa (Figura 3). Al analizar estadísticamente los resultados por cepa y por fuente de carbono, se determinó que la fuente de carbono que induce a una mayor producción de EPS fue la melaza, sacarosa y por último el manitol, siendo los aislado que produce mayor cantidad de EPS *Azotobacter chroococcus 001* y *Azotobacter vinelandii 004*.

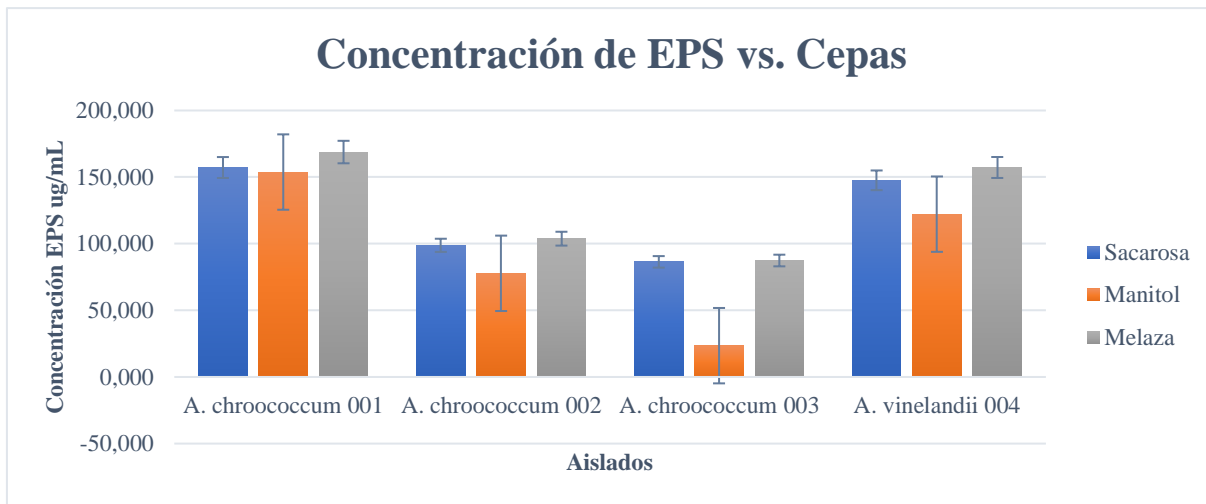


Figura 3. Producción de EPS con diferentes fuentes de carbono

5.5.2. Concentración de sales de magnesio.- Al evaluar tres concentraciones de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) para determinar qué tratamiento permite la obtención de una mayor concentración de mucopolisacáridos se observó que, cada aislado tiene un comportamiento diferente: el aislado 001 y 003 no tienen diferencias significativas entre concentraciones, ($p=0,012$) el aislado 2 produce mayor cantidad de EPS con el $0,16 \text{ g L}^{-1}$ de $MgSO_4$, el aislado 004 tiene elevada producción de EPS con $0,12 \text{ g L}^{-1}$ de $MgSO_4$, y no hubo diferencia significativa entre $0,16 \text{ g L}^{-1}$ y $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de concentración del compuesto empleado (Figura 3).

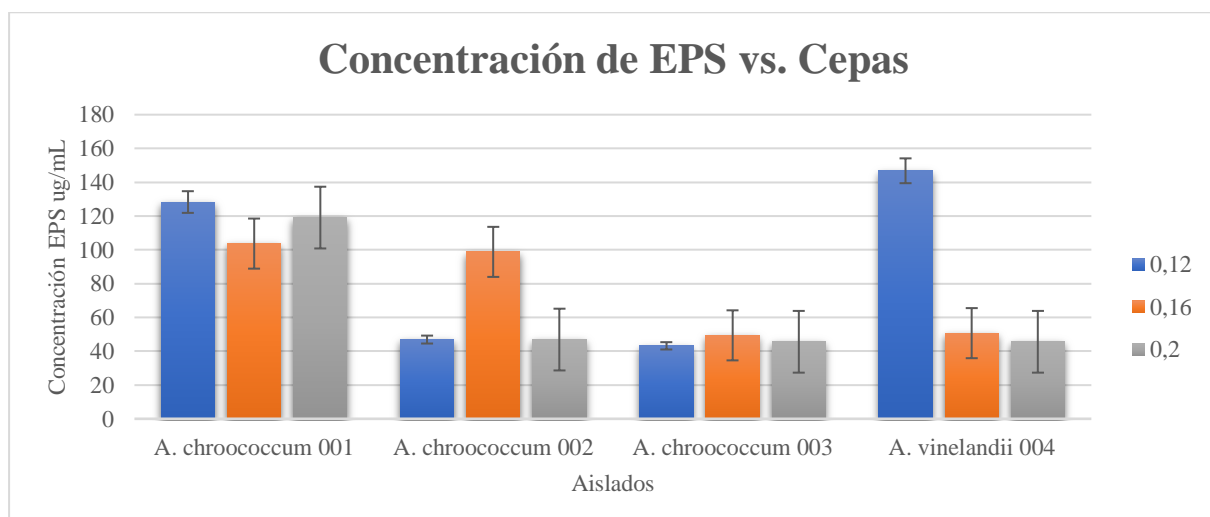


Figura 4. Producción de EPS en diferentes concentraciones de magnesio

5.5.3. Concentración de nitrógeno.- Se evaluaron tres cantidades de nitrógeno añadidas al medio para determinar cuál favorece la producción de mucopolisacáridos, evidenciando diferencia significativa ($p=0,08$), para el aislado *Aztb 003*, tras analizar los datos con la prueba de ANOVA de una vía, en el que, la adición de nitrógeno, sí mejora la producción de EPS. Al comparar entre aislados, el *Aztb 001* y el *Aztb 004* producen más EPS que el *Aztb 002* y *Aztb 003*. (Figura 5).

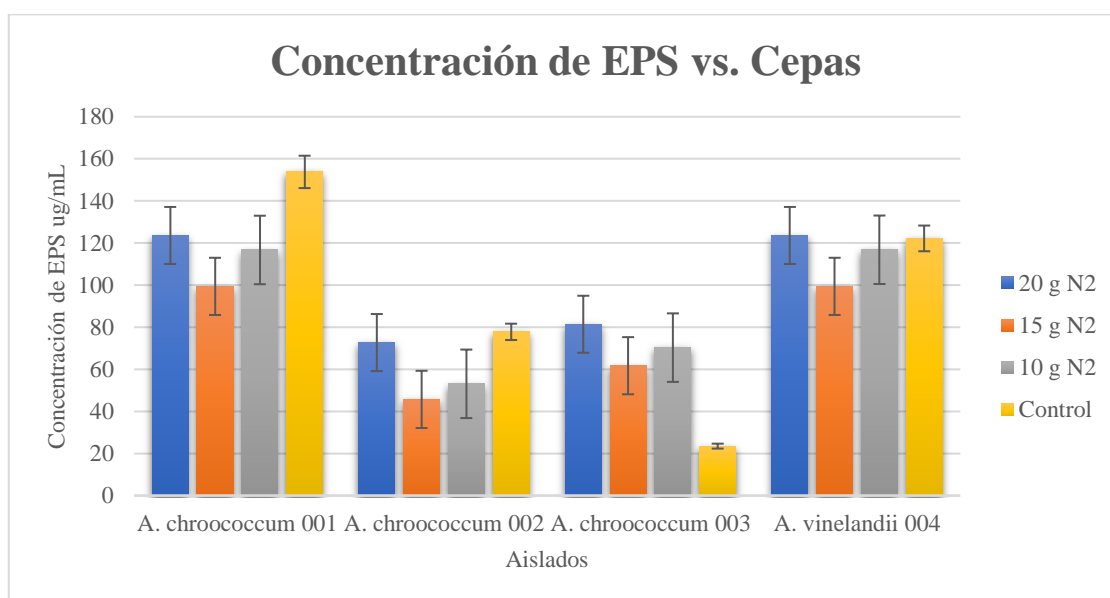


Figura 5. Producción de EPS en diferentes concentraciones de nitrógeno

6. DISCUSIÓN

El aislamiento de *Azotobacter* spp. se realizó mediante la técnica de gránulos de suelo, debido a que es la técnica *gold standard* para la obtención de este microorganismo (Aquilanti et al. 2004). Estos gránulos almacenan nitrógeno mineral, que es consumido por bacterias fijadoras de nitrógeno para su crecimiento, producción de pigmentos y productos extracelulares. Cuando el nitrógeno mineral de los gránulos de suelo se agota, la prevalencia de los fijadores no simbióticos de nitrógeno atmosférico como *Azotobacter* spp. (Aquilanti et al. 2004) se debe a que puede utilizar el nitrógeno atmosférico como fuente de este elemento. En esta investigación se utilizó el agar Ashby, que es un medio utilizado para el cultivo selectivo de especies de

Azotobacter spp. ya que utiliza el manitol como fuente de carbono y el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno y la composición de este medio favorece la producción de compuestos extracelulares (Escobar et al 2011).

De acuerdo con el manual de Bergey de bacteriología determinativa (Garrity et al. 2001), las colonias de *Azotobacter* spp. en medio Ashby son viscosas, transparentes y, tras 24 horas de incubación, adquieren un color marrón. Las bacterias son Gram negativas con un tamaño promedio de 3 μm , con formas levaduriformes o pleomórficas, como bacilos cortos y largos, también presentan quistes, siendo una característica distintiva de *Azotobacter* sp. para su identificación microscópica. Las características mencionadas concuerdan con los cuatro aislados.

Para completar la identificación fenotípica se llevaron a cabo cinco de pruebas bioquímicas (hidrólisis de almidón, catalasa, oxidasa y prueba de desnitrificación), las cuales dieron un resultado positivo. Efectivamente, *Azotobacter* spp. posee la enzima catalasa por lo que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, evidenciándose como efervescencia (Tejera et al. 2005). Por otro lado, *Azotobacter* spp. también posee la enzima citocromo C oxidasa, que transporta electrones hacia el compuesto N, N, N', N'tetrametil-p-fenilendiamina presente en el disco de oxidasa, el cual dará lugar a una reacción redox que implica un cambio de color a púrpura (Jiménez 2007). Un resultado positivo para la hidrólisis de almidón demuestra la capacidad de *Azotobacter* spp. de degradar este carbohidrato con la ayuda de las enzimas glucosidasas beta 1-4 y alfa 1-6 que rompen los enlaces de las cadenas ramificadas y lineales de glucosa (González et al. 2013). La identificación de *Azotobacter* spp. se complementó mediante la asimilación de azúcares, fuentes de carbono orgánicas que estimulan la actividad nitrogenasa de las bacterias de la familia *Azotobacteriaceae* y de esta forma promueve su potencial de fijación de nitrógeno, producción de compuestos extracelulares y el crecimiento celular (Valderrama 2013).

Para completar la identificación fenotípica se utilizó la galería API 20 NE, el cual es una serie de pruebas bioquímicas, que corroboraron la identificación realizada mediante pruebas convencionales. La identificación por galerías API, pese a ser una galería de pruebas bioquímicas tienen un porcentaje más elevado de identificación (54%) que equipos automatizados como Vitek (46%), siendo una alternativa viable la utilización de este sistema para la determinación de género de bacterias Gram negativas (Bosshard et al. 2016). Evstatieva et al. (2017) realizó la estandarización de galerías API 20 NE para identificación de bacterias del género *Azotobacter* (Evstatieva et al. 2017) y en este estudio lo utilizamos para comprobar la presencia de este género. Efectivamente, en este trabajo se identificaron las 4 aislados a nivel de género con el sistema API 20 NE.

Debido a la versatilidad metabólica de *Azotobacter* spp. y su rápida asimilación de carbohidratos, se modificaron las fuentes de carbono empleadas en el medio (Marrero et al. 2012). El caldo de cultivo Ashby-Sacarosa empleado para la cuantificación de EPS tiene sacarosa como fuente de carbono. Al reemplazarla por manitol o melaza, esta última aumenta la cantidad del precursor denominado GDP ácido manurónico, que es utilizado para la producción de alginato, un EPS excretado que contribuye a la agregación del suelo (Gauri et al. 2012). Los resultados obtenidos demostraron que la melaza y sacarosa son la fuente de carbono que induce la mayor cantidad de EPS. Estos compuestos favorecen el crecimiento exponencial prolongado de *Azotobacter* spp., lo que contribuye la mayor producción de compuestos extracelulares (Godoy y Díaz 2015). Según González et al. (2013); *Azotobacter vinelandii* asimila de mejor manera fuentes de carbono como la melaza y sacarosa en medios modificados. Esto es lo que sucedió con los aislados *Azotobacter chroococcum* 001 y *Azotobacter vinelandii* 004 por lo que resultaría eficaz la modificación de las fuentes de carbono para su producción masiva, siendo una mejor alternativa la melaza por su costo beneficio (González et al 2013).

Las sales presentes en el medio de cultivo Ashby-Sacarosa son cofactores enzimáticos indispensables para producción de compuestos extracelulares. El aumento de sales de magnesio induce estrés metabólico sobre *Azotobacter* spp. lo cual vuelve menos eficientes las vías metabólicas del carbono y nitrógeno por lo tanto limita la producción de EPS (Page y Tigerstrom 1979). Mientras que, si se hace una reducción de la concentración de la sal de magnesio en el medio, la bacteria entra en un estado de regulación metabólica y por lo tanto de estrés, lo que conlleva que la bacteria produzca compuestos extracelulares como los exopolisacáridos en mayor cantidad para formar un estadio de protección y de esta manera utilizar otros compuestos en respuesta a su falta de sales en el medio (Vermani et al 1995). Una vez más, cada aislado se comporta de manera diferente frente a condiciones similares (González et al 2016). Gauri et al. (2016) señala que los suelos contaminados limitan la cantidad de sales presentes en el suelo lo que estresa metabólicamente a las especies fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter*, las cuales producen mayor cantidad de productos extracelulares al estar en ambientes no favorables. En efecto, en este estudio, la cepa proveniente de un suelo contaminado es la que produce mayor cantidad de EPS, posiblemente por provenir de un ambiente estresante (Gauri et al 2016).

Reginawanti et al. (2017), señalan que *Azotobacter* spp. al estar en suelos que tienen baja cantidad de nitrato puede fijar nitrógeno atmosférico de manera más efectiva, producir una mayor cantidad de polisacáridos extracelulares y pigmentos. La enzima nitrogenasa es la que permite que fijadores de nitrógeno pueden asimilar el nitrógeno atmosférico, pero esta enzima es sensible al oxígeno y los EPS contribuyen a proteger a la nitrogenasa del oxígeno y bajo condiciones adversas (suelos contaminados o déficit nutricional) (Iañez 2005), pues el costo energético de este proceso es demasiado alto, por lo que limita otras funciones metabólicas. Algunos estudios señalan que la adición de nitrógeno al medio de cultivo Ashby-Sacarosa es una alternativa viable para reducir el consumo de adenosin trifosfato (ATP) empleado por

Azotobacter spp. y favorecer la producción de EPS, esto es lo que sucede con el aislado Aztb 003 (Vargas et al. 2001, Berrú y Quispe 2017). Otros, sostienen que la incorporación de nitrógeno al medio de cultivo no altera la producción de EPS, siendo similar a los valores obtenidos en el medio sin nitrógeno (Rubio 2013), que es lo que se corroboró en este estudio en los aislados Aztb 001, 002 y 004.

La identificación molecular realizada mediante PCR con los cebadores específicos: 16S-27 *forward*, que es propio de bacterias fijadoras de nitrógeno y 1655 *reverse*, que es propio de las bacterias de la familia *Azotobacteriaceae*, mostraron amplicones inespecíficos, por lo que se realizó una gradiente de temperatura, en la que se probaron temperaturas de 62°C como lo indica el fabricante y temperaturas de: 63, 64, 65, 66, 67 y 68, como lo describe (Bolívar et al. 2017). Este autor señala que los amplicones de las bacterias del género *Azotobacter* reaccionan de mejor manera a una temperatura de 65 o 66 °C, debido a que su genoma es termoestable a temperaturas de 60-66°C y si se sube o disminuye esa temperatura, tienden a destruirse o dañarse. De esta manera se el resultado obtenido tiene una explicación, debido a que con la temperatura de 65°C se obtuvo una banda más definida al momento de realizar la PCR y se visualizaron bandas de 600 pares de bases en un gel de agarosa, lo que permitió llegar a la identificación de las cuatro cepas: *Azotobacter chroococcum* 001, *Azotobacter chroococcum* 002, *Azotobacter chroococcum* 003 y *Azotobacter vinelandii* 004.

Además de su potencial para la producción de EPS, *Azotobacter* spp. tienen una gran capacidad de biorremediación, como lo señala Benítez et al. (2014). En efecto, *Azotobacter vinelandii* tiene la capacidad de remover casi en su totalidad remanentes de gasolina o compuestos hidrocarbonados de suelos que se encuentran contaminados gracias a la producción de compuestos extracelulares; sin embargo, es necesario un previo tratamiento con otro tipo de biorremediación en suelos que se encuentren con un porcentaje superior al 60% de

contaminación total por hidrocarburos o compuestos aromáticos (Benítez et al. 2014). De esta forma, la utilización de *Azotobacter* spp. para la biorremediación de suelos es una alternativa viable y de bajo costo y, debido a que los aislados *Azotobacter chroococcum* 001 y *Azotobacter vinelandii* 004 son las cepas que mayor cantidad de EPS producen, serían la alternativa ideal para producción a gran escala empleando las condiciones establecidas.

Otra de las características interesantes de *Azotobacter* spp. es su potencial como rizobacterias promotora de crecimiento vegetal (PGPR), (Gonzales y Yolanda 2019) no solo por su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, sino por otros mecanismos como producción de hormonas vegetales y otros compuestos bioactivos (Berrú y Quishpe 2017) El proceso de fijación biológica representada por géneros bacterianos como (*Azotobacter* spp., *Beijerinckia* spp., *Rhizobium* spp., entre otros), capta alrededor del 60% de nitrógeno disponible del suelo siendo la alternativa biológica y económica para el reemplazo de fuentes de nitrógeno contaminantes de suelo como lo son los fertilizantes químicos (Gonzales y Yolanda 2019). De esta manera la utilización de *Azotobacter* spp. en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos constituye es una alternativa sumamente atractiva, si se considera que esos suelos serán revegetados de forma natural o utilizados para la agricultura.

7. CONCLUSIONES

- A partir de biopilas y suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos se obtuvieron cuatro aislados de bacterias del género *Azotobacter* spp. con la capacidad de producir compuestos extracelulares y que pueden ser candidatos para ser agregantes de suelo.
- Mediante técnicas fenotípicas y moleculares como PCR se lograron identificar a nivel de género y especie los cuatro aislados obtenidos de *Azotobacter* spp.

- La información proporcionada durante el estudio indicó que, para el caso de *Azotobacter* spp., el nitrógeno no es un factor que altera la producción de exopolisacáridos, pues su ausencia o presencia hasta una concentración de 20 g L⁻¹ no afecta la síntesis de EPS.
- Por otro lado, la producción de EPS, por parte de algunos aislados, si se ve afectada por la disminución de las sales de magnesio, logrando una producción elevada de los mismos, lo que resulta una opción interesante a nivel industrial.
- De los tratamientos evaluados, la melaza y la sacarosa son los nutrientes que de mejor manera contribuyen a la producción de EPS. Por su bajo costo y disponibilidad, estas fuentes de carbono son una buena alternativa para inducir la producción de EPS a gran escala.
- *Azotobacter chroococcum* 001 y *Azotobacter vinelandii* 004, son los aislados que pueden ser de gran utilidad para utilizarse como agregantes de suelo y posibles biorremediadores, ya que tienen un porcentaje elevado de producción de EPS. Su producción a escala industrial, para el mejoramiento de la estructura de suelos arcillosos en biopilas debería realizarse tomando en cuenta las condiciones establecidas para una mayor producción de EPS.

RECOMENDACIONES:

- Evaluar la actividad biorremediadora de los aislados *Azotobacter* 001 y 004.
- Producir biomasa de estos aislados con melaza y sacarosa como fuentes de carbono y evaluar su efectividad para la agregación del suelo arcilloso.

AGRADECIMIENTOS

A Amazonía viva de Petroamazonas EP, en colaboración con la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por financiar y permitir esta investigación.

Adicionalmente un agradecimiento especial Mtr. Verónica Luna por ser mi directora de disertación y a la confianza que depositó en mí para llevar a cabo la investigación.

Un agradecimiento especial a los docentes involucrados en el proyecto de investigación, Diana Astorga, Magaly Estrella y Fernando Santacruz.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Agüero A. 2009⁵². Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*); en medio líquido a base de melaza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en Azucarera El Viejo, [tesis] [Costa Rica (Guanacaste)]: Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Ahmad F, Ahmad I, Saghir M. 2004⁵³. Producción de ácido acético indol por los aislados indígenas de *Azotobacter* y *Pseudomonas fluorescentes* en presencia y ausencia de triptófano. Academic Journals Tubitak. 29 (2): 2-4

Aldas A. 2014¹³. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a escala de laboratorio [tesis]. [Ecuador (Quito)]: USFQ

Altschul F, Gish G, Miller H, Myers M, Lipman I. 1990²⁹. Basic local alignment search tool. Ed.403. Rockville. PubMed. [10/03/2018; 10/12/2019]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712>

Anza H, Ortez P, González R, Ruiz A, Espinoza E. 2016⁴. Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usados mediante sistema de biopilas. Espacioimasd.unach.mx. Espacio I + D, Innovación más desarrollo. 5(12): 17-24.

- Aquilanti L, Favilli F, Clementi F. 2004³⁴. Comparación de diferentes estrategias para el aislamiento y la identificación preliminar de *Azotobacter* a partir de muestras de suelo. 36 (9). New York: Springer.
- Benítez R, Desgupta N, Villegas M, Sanchez J 2014⁵⁰. Biorremediación de suelos contaminados con 100000 PP de gasolina por bioestimulación con extracto fúngico, lombricomposta y fitorremediación con (*Zea mays / Azotobacter vinelandii*). Ciencia y tecnología, fuentes de innovación. 1(9): 485-496.
- Berrú E, Quispe G. 2017². Caracterización de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis L.* y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Lambayeque, Perú. (Universidad de Piura).
- Bolívar A, Rojas A, Torres Y, García P. 2017⁴⁹. PCR/DGGE System for detection of microorganisms in bovine blood stream established in cattle livestock regions of Merida State, Venezuela. Revista Científica. Vol 3 (Ed. 1); 4-5.
- Bosshard P, Zbinden R, Abels S, Altwegg R, Botger M. 2016³⁹. Secuenciación del gen 16S rRNA versus el sistema API 20 NE y la tarjeta VITEK 2 ID-GNB para la identificación de bacterias Gram-negativas no fermentativas en el laboratorio clínico. Pub Med, Vol. 2, (ed. 1); 3-8.
- Carter M, Gregorich E. 2007²⁴. Soil Sampling and Methods of Analysis. Florida. (Sampling methods, vol.22)
- Castillo, M. 2017¹⁸. Relación entre la producción de AIA y la actividad enzimática ACC desaminasa en presencia de metales. Revista Latinoamericana el ambiente y las ciencias. Vol. 8 (ed. 19); 6-9.

- Corrales L, Antolines D, Bohórquez J, Corredor A. 2015⁵⁴. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y afectadas a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Scielo. Vol. 12 (ed.13); 3-10.
- Das N y Chandran P. 2011⁹. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Research gate. Vol 2 (ed 14); 4-12.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1956³³. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. Ed. 16. París. disponible de <http://felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/fisio2008/PDF/PDF%20PRATICA/dubois.pdf>
- Egas J. 2010⁴³. Efecto de la inoculación con *Azotobacter* sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), genotipo nacional en la provincia de Esmeraldas. [tesis]. Universidad Central del Ecuador.
- Escobar C, Horna Y, Carreño C, Mendoza G. 2011²⁰. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. Scientia Agropecuaria, 2(1), 39-49.
- Evstatieva Y, Giorgieva T, Nikolova D. 2017²⁷. Technological characterization of strains *Azotobacter* using API 20 NE test. Rusia. EFEFA. [Actualizado 4 diciembre del 2019; Consultado 1 de Enero del 2020], Disponible de: http://www.quantumsolutions.bg/API_ZYM_20NE_03%202017.pdf
- Fundación Española para el desarrollo de la nutrición animal (FEDNA). 2015⁵⁵. Mallorca. FEDNA. [Actualizado 6 de diciembre del 2019; Consultado el 8 de diciembre de 2019], Disponible de: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/melazas-de-ca%C3%B1a

Flores J, Leal G, Ardila L, Cárdenas D. 2016⁵⁶. Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del norte de Santander (Colombia). Scielo. Vol.51(ed. 47): 4-10.

Fuster E. 2012⁵⁷. Descontaminación de suelos y acuíferos. Ed. 23. Málaga. Editorial Elearning, S.L. [22-11-2012; 4-09-2019]. Disponible desde: <https://books.google.com.ec/books?id=X7BWDwAAQBAJ&pg=PA132&dq=biop>

Gámez O, Rodríguez A, Cadre J, Cabrera J. 2017⁷. Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from contaminated soils with oily wastes. (Ed. 1). Sao Paulo. [10-09-2016; 12-08-2019]. Disponible desde: https://www.researchgate.net/profile/Odalys_Rodriguez_Gamez/publication/316621912_Screening_and_Characterization_of_Biosurfactant-Producing_Bacteria_Isolated_from_Contaminated_Soils_with_Oily_Wastes/links/59e0bb57a6fdcca9843878e9/Screening-and-Characterization-of-Biosurfactant-Producing-Bacteria-Isolated-from-Contaminated-Soils-with-Oily-Wastes.pdf

Garrity G, Boone D, Brenner D, Vos K, Krieg N, Goodfellow M, Bergey M. 2001³⁵. Bergey's manual of systematic bacteriology. 12 ed. New York. Springer (Identificación fenotípica de bacterias de rizosfera; (vol 12).

Gauri S, Mandal S, Pati B. 2012⁴¹. Impacto de los exopolisacáridos de *Azotobacter* en la agricultura sostenible. Microbiología aplicada y biotecnología. Vol 95 (ed.2); 331-338.

Godoy A, Díaz A. 2015⁴². Influencia de la velocidad de agitación sobre la producción de alginato en cultivos por lotes de una mutante de *Azotobacter vinelandii* no productora de PHB. [tesis]. [Chile (Valparaíso)]. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

- Gonzales M, Yolanda E. 2019⁵¹. Evaluación de un biofertilizante (*Azotobacter* y *Rhizobium*) para tarwi y frijol caupí como alternativa ambiental a la fertilización nitrogenada [tesis], Universidad Nacional Mayor San Marcos.
- González R, Iglesias A, Lorenzo J, Dibut B. 2017⁴⁸. Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* para su aplicación en la aclimatización de plantas *in vitro* de piña cv. 'Cayena lisa'. Biotecnología vegetal. Vol. 12. (núm 3); 16-19
- González Y, Meza J, González O, Cordoba J. 2013³⁷. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. Scielo. Vol. 4. (núm 4); 5-8.
- González A, Córdoba Y, Ojeda M, Hernández Y, Severo A. 2016⁴⁵. Detection and characterization of nitrogen fixing bacteria of a cultivated soil with *Eucaliptus* sp. Vol 01. (ed. 16); 325-329.
- Hernández A, García M, Morales M, Bojórquez J, García N, García N. 2008¹². El suelo: Fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo. [tesis]. [Colombia (Nayarit)] Universidad Autónoma de Nayarit.
- Iañez E. 2005⁴⁶. Microbiología general, problemas costo-energía, microorganismos fijadores de nitrógeno. Granada. Ed. Departamento de Microbiología; [09-05-2005; 14-07-2019]. Disponible desde: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm>
- Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI). 2017⁵⁸. Bacterias nitrificantes (bacterias oxidantes de amonio –AOB-, y bacterias oxidantes de nitritos –NOB-): Cuantificación por PCR en tiempo real. Ed. 13. Valencia. Editorial IVAMI. [07-08-2019; 01-12-2019]. Disponible desde: <https://www.ivami.com/es/microbiologia-de-abonos-y-fertilizantes/2316-bacterias-nitrificantes-bacterias-oxidantes-de-amonio-aob-y-bacterias-oxidantes-de-nitritos-nob-cuantificacion-por-pcr-en-tiempo-real>

- Jarman G, Canning J, Mykoluk S. 1978³². Cultivation, extraction and processing of Ramie fibre. Tropical science. Vol 4 (ed. 2): 4-10.
- Jiménez D. 2007¹⁸. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante análisis de restricción del DNA ribosomal 16S [tesis] [Colombia (Cali)]: Universidad Javeriana de Colombia.
- Jiménez D, Salvador J, Martínez M. 2011⁴². Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. Ed. 16. Colombia. NCBI Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768769/>
- Koohi A, Khodakaramian G, Zafari D. 2014²⁸. Biochemical, physiological and molecular characteristics of chickpea rhizobacteria from Kurdistan province, Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(8), 919-929.
- Kumar F, Stecher G, Tamura K. 2016³⁰. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Ed 33. Rockville. PubMed. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>
- Lara C y Vega S. 2017¹⁰. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. Teorema Ambiental. Vol 1 (ed. 1); 2-8.
- Martínez R. 2005³⁵. Fisiología de la asimilación de nitrógeno en "*Haloferax mediterranei*". Purificación y caracterización de Nitrato y Nitrito reductasas asimilativas [tesis] [España (Alicante)]: Universidad de Alicante.
- Martínez B, Márquez L, Sánchez J. 2016⁶. Bioestimulación de suelo impactado con aceite residual automotriz y fitorremediación con *Zea Mays*. [tesis] [Chile (Santiago de Chile)]: Universidad Lasallista.

- Marrero J, Amores I, Coto O. 2012⁴⁰. Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. Revista *ICIDCA*. 46 (4): 42-46.
- Mata J. 2006¹⁹. Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halofílicos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina* y *Salipiger* [tesis] [España (Granada)]: Universidad de Granada.
- Mathews C, Van Holde E, Appling D, Spencer J, Cahill A. 2013¹⁵. Biochemistry. Pearsons magazine. 4 (1): 65-99.
- Mau S, Vega K, Sánchez M. 2012²⁵. Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Dialnet. 42(4): 45-52.
- Meza J, Rico J, Ruiz R, Juan S. 2016¹⁷. Bioestimulación de suelo contaminado con 40000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Cicer arietinum* y *Burkholderia cepacia*. [tesis] [México (Ciudad de México)]: Universidad Autónoma de Chiapa.
- Molina D, Pardo J, Martínez M, Salvador J. 2009²³. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. Revista javeriana. 14 (1): 16-26.
- Monsalve W. 2017⁵. Aislamiento de bacterias presentes en el suelo de cultivo de cacao impactado con una concentración de cadmio a 18 ppm. Fitecvirtual. 15(2): 19-54
- Moreno J, Vargas C, López M, Sánchez G. 2001³¹. Crecimiento y producción de exopolisacáridos por *Azotobacter vinelandii* en medios que contienen ácidos fenólicos. Sfam. Vol 86. (ed. 3); 6-12.

- Navarro J. M. S. 2018¹⁴. Aprovechamiento de recursos y manejo de suelo ecológico. Ed. 1. Antequera (Málaga): AGAU0108. IC Editorial. [05-06-2018; 09-09-2019] Disponible desde: <https://books.google.com.ec/books?id=3m9gDwAAQBAJ&pg=PT143&d>
- Navarrete A, Chocobar A, Fonteyne S, Jespers N, Kienl F, Sayre D, Verhulst N. 2013³. Contenido de humedad del suelo (Guía No. 1142). Ciudad de México: CCAFS. Disponible desde: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:H4a1iFUv66cJ:conservacion.cimmyt.org/es/component/docman/doc>
- Núñez J. 2001⁸. Fundamentos de Edafología. Ed. 02. San José: EUNED. [03-08-2001; 04-11-2019] Disponible desde: <https://books.google.es/books?id=dpAChUt7xxoC&pg=PA76&dq>
- Page W, Tigerstrom M. 1979⁴³. Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology. Vol 21. (ed.09): 1059-1061.
- Patil V. 2011⁵⁹. Producción de ácido indol acético por *Azotobacter* sp. Ed. 1. París: Update Publishing; [06-05-2011; 14-12-2019]. Disponible desde <https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/839>.
- Ponce D. 2014¹. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. [tesis] [Colombia (Estatal)]: Universidad Nacional de Colombia.
- Quezada J. 2012²¹. Selección in vitro de *Azotobacter* spp. promotores de crecimiento vegetal aislado de suelos de cultivo de *Zea Mays* "maíz" del distrito de Laredo [tesis] [Perú (Trujillo)]: Universidad Nacional de Trujillo.
- Rámirez L, Arguelles I. 2005⁶⁰. Atenuación natural de suelos contaminados con hidrocarburos. [tesis] [México (Ciudad de México)]: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Reginawanti H, Mulyani Z, Osok M. 2017¹⁶. Población de *Azotobacter*, nitrógeno del suelo y crecimiento de maní en colas contaminadas con mercurio inoculadas con *Azotobacter*. Ed. 2. Padjardjara: INdones; [03-07-2017; 09-10-2019] Disponible desde: <https://jdmlm.ub.ac.id/index.php/jdmlm/article/view/423>
- Rubio E. 2013⁴⁸. Caracterización molecular y funcional de bacterias del género *Azotobacter* infectadas de suelos de la república argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo. [tesis] [Argentina (Buenos Aires)]: Universidad Nacional de Luján.
- Sánchez D, Pérez J, Castellanos L, García J, Espitia A. 2018⁶¹. *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum* como bioestimulantes en *Ipomoea batatas Lam.* cultura. Ed. 3. Costa Rica: Mag.go; [06-02-2018; 04-10-2019] Disponible desde http://www.mag.go.cr/rev_meso/v30n02_563.pdf
- SIGMA. 2019⁶². Agar Ashby. Canadá: SIGMA; Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/a1840dat.pdf>
- Tejera NLCMMGJ, Lluch C, Martinez-Toledo MV, Gonzalez-Lopez J. 2005³⁶. Aislamiento y caracterización de cepas de *Azotobacter* y *Azospirillum* de la rizosfera de la caña de azúcar. *Planta y suelo*, 270 (1), 223-232.
- Thaweenut M, Marinti E, Valderrama L, Portela C, Villamarin J, Marinks S, Puertas L. 2015²⁶. Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp*). Science direct. Vol 3 (ed. 1): 5-25.

- Thompson M, Troeh F. 1988¹¹. Los suelos y su fertilidad. Reverte. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=AegjDhEIVAQC&printsec=frontcover&dq=Thompson>
- Trinidad A, Rivera M, Roldán A, Armando L, Quintero R, Hernández J, 2016⁶³. Uso de *Leersia hexandra* (Poaceae) en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. Revista de biología tropical. Vol 65(1); 4-6
- Valderrama L. 2013³⁸. Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp*). Cali. Revista univalle. Vol 36 (02); 66-69.
- Vargas M, López M, Elorrieta M, Suárez F y Moreno J. 2001⁴⁷. Influencia de factores nutricionales y ambientales en la producción de polisacáridos por *Azotobacter vinelandii* cultivada en ácido 4-hidroxibenzoico. Springer Link. Vol. 5. (Ed. 10); 14-19.
- Vermani M, Kelkar S y Kamat M. 1995⁴⁴. Producción y optimización de ciertos parámetros de crecimiento para un exopolisacárido de *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 aislado de una rizosfera vegetal. Revista de fermentación y bioingeniería. Vol 80. (ed. 6); 1-5.
- Vu B, Chen M, Crawford J, Ivanova P. 2009²². Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in biofilm formation. Molecules. Scielo. Vol 14 (Ed. 7); 2535-2544.

