

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS CON POTENCIAL  
DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO PARA SU APLICACIÓN  
COMO BIOINOCULANTE EN EL SECTOR AGROINDUSTRIAL**

Trabajo de graduación presentado por Oscar Hugo de la Parra Motta  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,  
2024



**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS CON POTENCIAL DE  
FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO PARA SU APLICACIÓN  
COMO BIOINOCULANTE EN EL SECTOR AGROINDUSTRIAL**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS CON POTENCIAL  
DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO PARA SU APLICACIÓN  
COMO BIOINOCULANTE EN EL SECTOR AGROINDUSTRIAL**

Trabajo de graduación presentado por Oscar Hugo de la Parra Motta  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,  
2024

Vo. Bo.

(f)   
\_\_\_\_\_

Lic. Carlo Roberto Martínez Joachin


Terna examinadora

(f)   
\_\_\_\_\_

Lic. Carlo Roberto Martínez Joachin

(f) \_\_\_\_\_

Msc. Ing. Gamalhel Giovanni Zambrano Ruano

(f)   
\_\_\_\_\_

Ing. Carmen Alieta Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala, 4 de enero de 2024

## PREFACIO

Dedico este trabajo a Dios, por estar a mi lado a lo largo de la elaboración de este proyecto. Por darme la fuerza y las energías para continuar incluso en los momentos que pensé que ya no podía. Por ser mi guía incondicional y mi mentor en todas las decisiones de mi vida, por apoyarme a cumplir todos mis sueños, metas y anhelos.

Dedico este trabajo a toda mi familia, a mis papas, mis hermanas, mis abuelitas y Miriam por ser ese motor que me ayuda siempre a seguir adelante. Por siempre darme ánimos y apoyarme en todas las decisiones de mi vida.

A mi mamá, por darme la oportunidad de estudiar en una universidad tan prestigiosa como la UVG, por ser mi modelo a seguir y enseñarme a nunca darme por vencido y a luchar por mis sueños. Por ser la mujer que más admiro y amo en este mundo.

A mi papá, por siempre darme un empujón y por siempre sacarme una sonrisa en los momentos difíciles. Por siempre impulsarme a ser una mejor persona y enseñarme a luchar por mis sueños. Por enseñarme que lo que más cuesta es lo que más satisfacción da.

A mi novia, por siempre llenar mis días de tanta alegría. Por apoyarme de forma incondicional y por impulsarme a ser una mejor persona día con día.

A mi asesor, Lic. Carlo Martínez por haberme apoyado desde el inicio de esta aventura. Por aguantar las insistencias y preguntas constantes. Por guiarme, asesorarme y ser una pieza fundamental que me ayudo a tomar las mejores decisiones a lo largo de la elaboración de mi trabajo de graduación.

A Dalia Lau Bonilla Ph.D, por apoyarme desde un inicio brindándome ideas, asesoramiento y ayudándome a tomar decisiones claves durante mi experimentación que me permitieron culminar con mi trabajo de graduación.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
PREFACIO .....	i
LISTADO DE TABLAS .....	iv
LISTADO DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	2
III. OBJETIVOS .....	3
A. GENERALES.....	3
B. ESPECÍFICOS .....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
A. BASES TEÓRICAS .....	4
1. BACTERIAS .....	4
2. MICROBIOMA .....	4
3. MICROBIOTA DEL SUELO.....	6
4. ASOCIACIÓN Y DINÁMICA PLANTA-MICROBIOMA .....	7
5. COLONIZACIÓN E INTERRELACIÓN .....	8
6. INTERACCIONES MICROBIANAS .....	8
B. FUNCIÓN DE LOS MICROBIOMAS EN PLANTAS.....	9
1. ADQUISICIÓN DE NUTRIENTES.....	9
C. BIOTECNOLOGÍA VERDE .....	10
D. BIOINOCULANTES, ESPECIFICACIÓN Y TIPOS .....	11
1. FIJACIÓN DE FÓSFORO.....	13
2. FIJACIÓN DE NITRÓGENO .....	14
E. ENZIMA NITROGENASA .....	16
F. MECANISMO DE LA NITROGENASA.....	17
3. FUNCIÓN Y ROL EN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO .....	19
G. CICLO DEL NITRÓGENO.....	20
H. COMPUESTOS NITROGENADOS .....	22
1. MICROORGANISMOS ENDÓFITOS FIJADORES DE NITRÓGENO .....	22
2. MECANISMO DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO POR BACTERIAS ENDÓFITAS.....	23

3.	SIMBIOSIS PLANTAS DE JITOMATE Y BACTERÍAS ENDÓFITAS .....	24
4.	MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN .....	25
V.	METODOLOGÍA .....	27
A.	PREPARACIÓN DE MEDIOS.....	27
1.	AGAR NUTRITIVO.....	27
2.	MEDIO NFB.....	27
3.	CALDO NUTRITIVO .....	30
B.	PROCESO DE ESTERILIZACIÓN .....	31
1.	CRISTALERÍA.....	31
2.	MEDIOS DE CULTIVO .....	31
C.	MUESTREO .....	31
D.	AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS .....	32
E.	RE AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS .....	33
F.	EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO .....	33
G.	CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN .....	34
H.	PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS (PREINÓCULO) .....	35
I.	PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS (INÓCULO) .....	35
J.	MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE <i>BACILLUS T.</i> UTILIZANDO EL MÉTODO DE MEDICIÓN DE NITRÓGENO TOTAL DEL KIT DE HACH	36
VI.	ANTECEDENTES.....	38
VII.	RESULTADOS .....	40
A.	EVALUACIÓN DE CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO .....	40
B.	CARACTERIZACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO .....	41
C.	CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO FIJADO POR <i>BACILLUS</i> <i>THURINGIENSIS</i> EN REACTOR DE 1 LITRO.....	42
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	43
IX.	CONCLUSIONES .....	51
X.	RECOMENDACIONES .....	52
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	53
XII.	ANEXOS.....	58
A.	DATOS ORIGINALES.....	58
B.	DATOS CALCULADOS .....	61
C.	CALCULOS DE MUESTRA.....	65

D. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA .....	67
A. SEGUNDO AISLAMIENTO DE COLONIAS BACTERIANAS .....	68
B. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y TINCIÓN DE GRAM .....	73
C. OBTENCIÓN DE COLONIAS PURAS.....	74
D. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO EN MEDIO NFB ....	79
E. REPORTES DE SERVICIO DE SECUENCIACIÓN .....	83
XIII.GLOSARIO.....	93

### LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Actividad fijadora de nitrógeno de colonias aisladas .....	40
Tabla 2. Identificación estándar 16S rRNA .....	41
Tabla 3. Evaluación de rendimiento de fijación.....	42
Tabla 4. Determinación de la biomasa final por peso seco .....	58
Tabla 5. Componentes de medio libre de nitrógeno NFB .....	59
Tabla 6. Descripción morfológica colonial obtenida mediante estriado en placa. ....	73

### LISTADO DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Composición de las poblaciones microbianas .....	6
Figura 2. Proporción de bacterias presentes en los diferentes microbiomas .....	7
Figura 3. Adquisición de nutrientes en las plantas .....	10
Figura 4. Estructura del cofactor FeMo de la enzima nitrogenasa. ....	17
Figura 5. Mecanismo de acción de la nitrogenasa.....	18
Figura 6. Ciclo del nitrógeno y su relación con los factores bióticos y abióticos. ....	21
Figura 7. Diagrama representativo del balance de masa y energía para un lote en biorreactor .....	58
Figura 8. Representación gráfica de número de colonias totales aisladas por muestra y explante ..	60
Figura 9. Cuantificación promedio de nitrógeno a lo largo del tiempo.....	60

Figura 10. Procesamiento de las muestras de tejido vegetal y primer aislamiento de bacterias .....	67
Figura 11. Obtención de colonias bacterianas: Mx1, raíz. ....	68
Figura 12. Obtención de colonias bacterianas: Mx1, Hoja. ....	68
Figura 13. Obtención de colonias bacterianas: Mx1, tallo. ....	69
Figura 14. Obtención de colonias bacterianas: Mx2, Tallo.....	69
Figura 15. Obtención de colonias bacterianas: Mx2, Hoja. ....	70
Figura 16. Obtención de colonias bacterianas: Mx2, Raíz.....	70
Figura 17. Obtención de colonias bacterianas: Mx3, Hoja. ....	71
Figura 18. Obtención de colonias bacterianas: Mx3, Tallo.....	71
Figura 19. Obtención de colonias bacterianas: Mx3, Raíz.....	72
Figura 20. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx1, Raíz. ....	74
Figura 21. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx1, Hoja.....	74
Figura 22. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx1, Tallo. ....	75
Figura 23. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Tallo. ....	75
Figura 24. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Tallo. ....	76
Figura 25. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Hoja.....	76
Figura 26. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Raíz. ....	77
Figura 27. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx3, Hoja.....	77
Figura 28. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx3, Tallo. ....	78
Figura 29. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX1, Raíz.....	79
Figura 30. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX1, Hoja.....	80
Figura 31. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX2, Tallo.....	81
Figura 32. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX3, Hoja.....	82
Figura 33. Resultados de la secuenciación 16S rRNA de colonia N3.....	83
Figura 34. Espectro de ADN para la muestra N3.....	84
Figura 35. Resultados de la secuenciación 16S rRNA de colonia N4.....	86
Figura 36. Espectro de ADN para la muestra N4.....	87
Figura 37. Preparación de preinóculo e inóculo para realización de curva de crecimiento .....	89
Figura 38. Preparación e inoculación de reactor de 2 litros .....	90
Figura 39. Cuantificación de la cantidad de nitrógeno atmosférico fijado por bacterias aisladas empleando el kit de Hach. ....	91
Figura 40. Conteo celular y medición de la viabilidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> posterior al tiempo de fermentación.....	92

## RESUMEN

Los bioinoculantes aprovechan microorganismos y compuestos biológicos para desencadenar respuestas fisiológicas que potencian la eficiencia nutricional de las plantas. Estos agentes beneficiosos también mejoran la tolerancia al estrés, estimulan el metabolismo, favorecen el rendimiento de las plantas y aumentan la absorción de elementos esenciales como el nitrógeno y el fósforo. Existen diversos tipos de bioinoculantes, cada uno con sus propias propiedades, como los biofijadores, biofertilizantes, aceleradores de compost, PGPR (bacterias promotoras del crecimiento de las plantas), bioestimulantes y biosolubilizadores. La fijación biológica del nitrógeno desempeña un papel crucial en la vida de las plantas. Es el elemento más abundante en ellas después del carbono, el oxígeno y el hidrógeno, sin embargo, es el más limitante para su crecimiento. Aproximadamente el 80% de la atmósfera está compuesta de nitrógeno en una forma casi inerte, lo que lo hace inaccesible para la mayoría de los seres vivos.

Es por eso que, en el presente trabajo se aislaron, bacterias endófitas con potencial para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, de esta forma, ayudar a las plantas a reducir el nitrógeno atmosférico en formas más fáciles de absorción como el amonio o compuestos de nitrógeno orgánico. Para ello se llevó a cabo el aislamiento de bacterias endófitas de tejido vegetal de jitomate, a las cuales se les sometió a un proceso de esterilización superficial para poder encontrar los endófitos. Posterior al aislamiento, por medio de la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal se identificó la bacteria *Bacillus thuringiensis* aislada a partir de las plantas. Por último, se llevó a cabo una fermentación en un reactor de 2 litros con medio libre de nitrógeno (NFB), para posteriormente llevar a cabo la cuantificación de nitrógeno atmosférico fijado por la bacteria, estas mediciones se realizaron de manera triplicada, abarcando mediciones iniciales, intermedias y finales empleando el método de cuantificación de nitrógeno total del Kit de Hach. Se obtuvo un rendimiento de fijación biológica de nitrógeno de  $15.147 \text{ mg/L} \pm 0.707$  por parte de *Bacillus thuringiensis* tras 2 semanas de fermentación.

## I. INTRODUCCIÓN

Las condiciones ambientales provocadas por el cambio climático han desencadenado un desbalance en el ciclo de regeneración de los suelos, provocando sequías e inundaciones que dificultan la agricultura convencional. Esto deja a países como Guatemala con un aumento de la inseguridad alimentaria. La seguridad alimentaria se define como el acceso permanente para toda persona a los alimentos necesarios para gozar de una vida activa y saludable. En este sentido, el uso de compuestos inorgánicos como los fertilizantes son necesarios y gracias a ellos se obtienen beneficios para la producción alimenticia. Sin ellos se tendrían que cultivar miles de hectáreas adicionales en nuestro país para poder alimentar a una población en constante crecimiento. Sin embargo, su aplicación requiere de un análisis y evaluación para determinar la cantidad de nutrientes requeridos por la rizósfera, para evitar su uso indiscriminado. El uso irracional de los productos inorgánicos puede llegar a alterar los ciclos de regeneración de los suelos, contaminar el agua del manto freático y afectar nuestro entorno.

De esta forma, ha sido necesario adaptar tecnologías pertinentes para reducir el uso de los fertilizantes como lo serían los bioinoculantes, para un manejo ecológico y sustentable de los suelos y los cultivos. Los bioinoculantes hacen uso de microorganismos y compuestos biológicos que desencadenan respuestas fisiológicas que mejoran la eficiencia nutricional, tolerancia al estrés, estimulan el metabolismo, favorecen el desempeño de las plantas y la absorción de elementos indispensables como el nitrógeno y fósforo. Los distintos agentes bioinoculantes son variados y con diferentes propiedades: biofijadores, biofertilizantes, aceleradores de compost, PGPR (Plant growth promoting Rhizobacteria), bioestimulantes y biosolubilizadores. (Valero et al., 2018) (Maji et al., 2017). El nitrógeno es un elemento indispensable para la vida. Es el elemento más abundante en las plantas después del carbono, el oxígeno y el hidrógeno, y a la vez el más limitante para su crecimiento. Además, Corresponde casi al 80% de los gases presentes en la atmósfera, el cual permanece de forma casi inerte, lo que hace que no pueda ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos.

De esta forma, la mejor estrategia para lograr la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés, la estimulación del metabolismo, la fijación de nitrógeno y otros nutrientes indispensables para los cultivos, es mediante el uso de bioinoculantes, los cuales promueven cambios fisiológicos y morfológicos que ayudan a mejorar la adaptación, crecimiento y productividad de las plantas en condiciones adversas. De igual forma, los bioinoculantes, en comparación con los compuestos nitrogenados químicos, reducen los riesgos de lixiviación de nitratos, desnitrificación y la volatilización de amoníaco en el medio ambiente siendo una alternativa viable y ecológicamente sustentable. Es por esto, que en el presente trabajo se pretende aislar bacterias endófitas de tejido vegetal con propiedades bioinoculantes, que cuenten con efectos de biofijación para ayudar a las plantas a reducir el nitrógeno atmosférico en formas más fáciles de absorción como el amonio o compuestos de nitrógeno orgánico.

## II. JUSTIFICACIÓN

Dentro de las actividades principales de la economía de Guatemala se encuentra el sector agrícola, el cual ha contribuido con el 14% del PIB, siendo desde mucho tiempo atrás una de las principales fuentes de ingreso para la economía del país y fuente alimenticia para la población. La escasez y los altos precios de los fertilizantes en todo el mundo provocados por la pandemia han impactado en la producción agrícola a lo largo de los tres últimos años, afectando la sostenibilidad de la agricultura y la liquidez de los productores agrícolas.

Desde finales de 2020 muchos productos como la urea y los fertilizantes nitrogenados han sufrido un incremento súbito, a la fecha, los incrementos de dichos productos ya superan el 150% (Yara & Stone, 2022). Factores como los precios de combustibles y crisis energética, el aumento en el precio de los fletes marítimos, la subida del dólar y las restricciones de los dos mayores exportadores de fertilizantes Rusia y China, son de las principales causas de dicho incremento. De esta forma, resulta de gran interés y de gran ayuda el uso de las técnicas de biotecnología verde en el sector Agropecuario y Agroindustrial para el estudio y mejoría de los cultivos en nuestro país; permitiendo así una mayor productividad con reducción de costos, calidad de productos y simbiosis con el medio ambiente.

Una de las estrategias para lograr lo mencionado, es el uso de bioinoculantes, los cuales al ser de origen biológico son de gran beneficio para los cultivos, el medio ambiente y las personas que lo utilizan. Además, actúan de diversas formas sobre la planta, teniendo efectos bioestimulantes, biocontroladores, biosolubilizadores y biofijadores, ayudando a mejorar la adaptación, crecimiento y productividad de los cultivos en diferentes condiciones. Hoy en día existen variedad de productos con distintos usos y efectos, sin embargo, la mayoría de estos corresponden a productos inorgánicos.

De esta forma, resulta de gran interés el aislamiento de bacterias con propiedades bioinoculantes, que cuente con efectos de biofijación para ayudar a las plantas a reducir el nitrógeno atmosférico en formas más fáciles de absorción como el amonio o compuestos de nitrógeno orgánico. Para así crear una alternativa ecológicamente viable para reducir el uso de compuestos inorgánicos y así poder aportar valor a las actividades agrícolas del país.

### **III. OBJETIVOS**

#### **A. GENERALES**

- Aislar bacterias con potencial de fijación nitrógeno atmosférico a partir de tejido vegetal para utilizarlas como bioinoculante en el sector agroindustrial.

#### **B. ESPECÍFICOS**

- Realizar ensayo de crecimiento de las cepas aisladas de tejido vegetal en medio de cultivo NFB para evaluar sus capacidades como potenciales fijadores de nitrógeno atmosférico.
- Caracterizar la cepa fijadora de nitrógeno aislada mediante secuenciación del 16S rRNA para determinar su especie.
- Cuantificar la cantidad de nitrógeno atmosférico fijado por las bacterias aisladas por medio del kit de Hach, para evaluar el rendimiento de fijación en un fermentador de volumen de 1 litro.

## **IV. MARCO TEÓRICO**

### **A. BASES TEÓRICAS**

#### **1. BACTERIAS**

Las bacterias son microorganismos unicelulares y procariotas que conforman uno de los grupos más abundantes y diversos del planeta. Son organismos extremadamente pequeños, generalmente de forma esférica, bacilar o espiral, y carecen de un núcleo definido, orgánulos membranosos y estructuras internas complejas. A pesar de su simpleza estructural, las bacterias son extraordinariamente diversas en su fisiología, metabolismo y ecología, lo que les permite habitar una amplia gama de entornos, desde los más extremos, como las profundidades del océano, hasta los más comunes, como la piel humana. Las bacterias se clasifican principalmente en función de su forma (cocos, bacilos, espirilos), su agrupación (solitarias, en cadenas, en grupos) y su respuesta a la tinción de Gram (grampositivas, gramnegativas), lo que refleja diferencias en la composición de su pared celular <sup>1,3,10</sup>.

Esta diversidad estructural y funcional permite que las bacterias desempeñen una amplia variedad de funciones ecológicas y biológicas, desde la descomposición de materia orgánica y la fijación de nitrógeno atmosférico, hasta la fermentación de alimentos y la producción de antibióticos. Su importancia en los ecosistemas es incalculable, ya que las bacterias son esenciales para el ciclo de nutrientes, la purificación del agua y del suelo, y la producción de alimentos. Además, las bacterias tienen una relevancia considerable en la medicina y la biotecnología, ya que son la fuente de muchos antibióticos y enzimas industriales, y se utilizan en la ingeniería genética y la producción de alimentos fermentados. Sin embargo, algunas bacterias también pueden ser patógenas y causar enfermedades en plantas, animales y humanos, lo que subraya la importancia de comprender y controlar su crecimiento y propagación <sup>1,3,10</sup>.

#### **2. MICROBIOMA**

Un microbioma se define como una comunidad microbiana características que ocupa nichos ecológicos específicos en los cuales se desempeñan variedad de funciones. Las plantas proporcionan una multitud de nichos para el crecimiento y proliferación de una diversidad de microorganismos, incluidos bacterias, hongos, protistas, nematodos y virus (la microbiota vegetal) <sup>1,3,10</sup>. Estos microorganismos pueden formar asociaciones complejas con las plantas y tienen un papel importante en la promoción de la productividad y la salud de la planta en entornos naturales <sup>7,13</sup>. Cabe mencionar que la composición de las poblaciones de los microorganismos puede variar dependiendo del ambiente en el que se encuentren, teniendo uno o varios microbiomas por cada región u órgano de la planta como se muestra en la Figura 1.

Los miembros de un microbiota vegetal comprenden microorganismos benéficos, neutros y patógenos. Se ha demostrado que las comunidades microbianas asociadas con sus huéspedes promueven el crecimiento de las plantas, la absorción de nutrientes y la resistencia

a los patógenos. Aunque los miembros individuales de las comunidades microbianas asociadas a plantas pueden poseer ciertos rasgos beneficiosos, la manifestación de un rasgo en la comunidad es una propiedad emergente que no puede predecirse a partir de los miembros individuales <sup>10,12,14,15</sup>.

Por ejemplo, *Pseudomonas spp.* puede suprimir los patógenos de las plantas a través de la antibiosis y la competencia, sin embargo, la supresión general de enfermedades del suelo es una propiedad emergente que depende de múltiples factores, incluida la dinámica de la población del patógeno, los antecedentes genéticos tanto del patógeno como del huésped, las condiciones bióticas y abióticas, y la composición y diversidad del microbiota vegetal <sup>15</sup>. Los beneficios conferidos por los microorganismos a sus plantas hospedantes pueden ser directos, incluida la transformación y translocación de nutrientes esenciales en el suelo para ponerlos a disposición de las plantas (por ejemplo, fijación de nitrógeno) <sup>17,19</sup>.

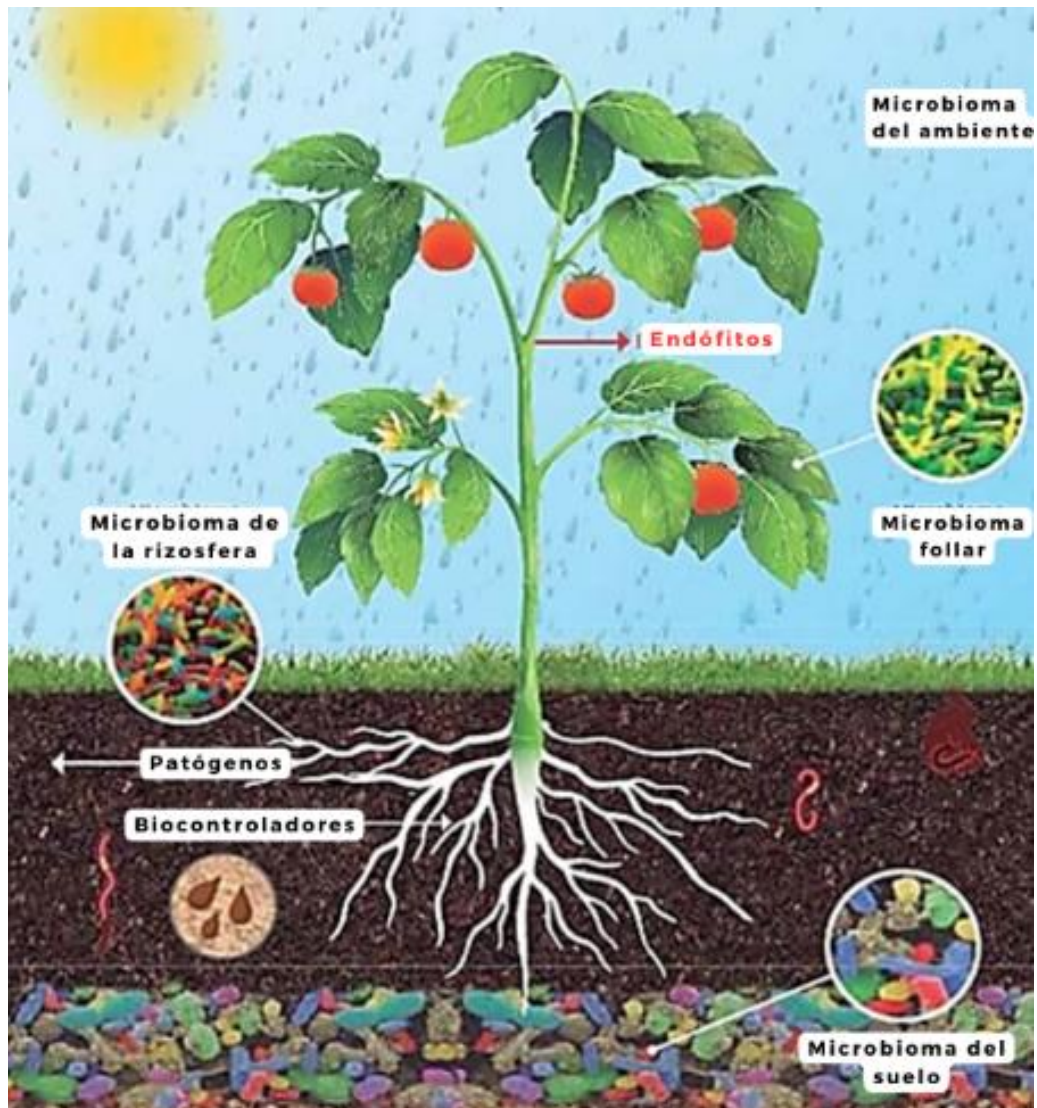


Figura 1. Composición de las poblaciones microbianas

### 3. MICROBIOTA DEL SUELO

Los suelos contienen una biota viva formada por una gran cantidad de bacterias, hongos y especies animales. Un  $\text{cm}^3$  de suelo fértil puede contener hasta más de 1 millón bacterias pertenecientes a un ciento de especies como se muestra en la Figura 2. Los hongos son más difíciles de enumerar, pero en condiciones de suelo ligeramente ácidas, como en los suelos forestales, su biomasa supera a la de la biomasa bacteriana <sup>1,3,10</sup>. Los hongos son el grupo de microorganismos del suelo más importante implicado en el ciclo del carbono, con 40-200 g de materia seca micelial por metro cuadrado de suelo <sup>7,10</sup>.

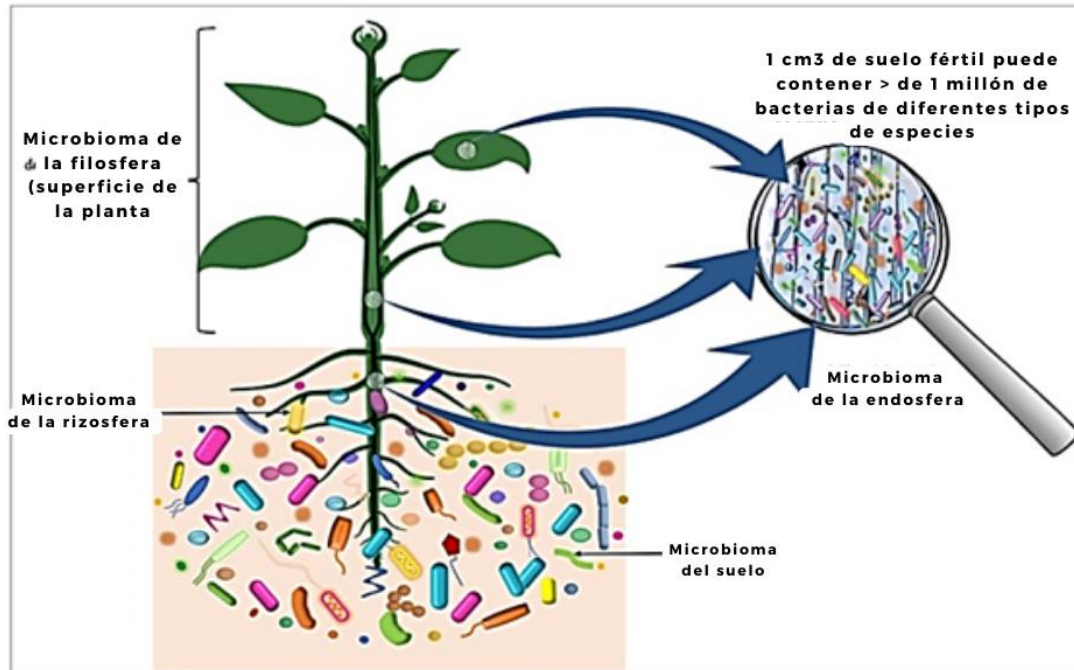


Figura 2. Proporción de bacterias presentes en los diferentes microbiomas

#### 4. ASOCIACIÓN Y DINÁMICA PLANTA-MICROBIOMA

El ensamblaje de un microbioma asociado a una planta es una sucesión, proceso de varios pasos que está determinado por la dispersión, las interacciones de las especies, el medio ambiente y el huésped. Los primeros colonizadores podrían transmitirse verticalmente, a través de los padres, a través de vías de transmisión de semillas<sup>15,17</sup>. Por lo tanto, estos microorganismos pueden carecer de características que de otro modo facilitarían la colonización temprana, por ejemplo, la dispersión activa, y en su lugar tienen características seleccionadas por las plantas hospedadoras que dependen de las diferencias en términos de morfología y anatomía de las semillas<sup>15,6</sup>. Una vez que las semillas germinan, es probable que el ensamblaje del microbioma sea impulsado por la transferencia horizontal, donde los microorganismos transmitidos por las semillas se asocian preferentemente con los tejidos de las plantas en la superficie, mientras que los microorganismos derivados del suelo se asocian principalmente con la rizosfera y las raíces<sup>4,7</sup>. Es probable que el microbioma asociado a la raíz ser reclutado y ensamblado dinámicamente durante el ciclo de vida de su planta huésped, y los cambios temporales en este microbioma son consistentes en todas las ubicaciones geográficas<sup>4,7,8</sup>.

La composición de los microbiomas, que puede ser muy dinámica en la fase vegetativa temprana, comienza a converger a lo largo del crecimiento vegetativo y se estabiliza durante la fase reproductiva<sup>6</sup>. El muestreo repetido para estudiar la estructura de los microbiomas asociados a las plantas ha demostrado que, aunque su composición varía con el tiempo, una pequeña fracción de los taxones microbianos que pertenecen al núcleo de la microbiota se mantienen constantemente en abundancias relativas elevadas durante el

desarrollo de las plantas <sup>6,19</sup>. Estos microorganismos poseen múltiples características, para una colonización eficiente, tolerancia al estrés y efectos beneficiosos sobre los hospedadores. Además, los rasgos como la tolerancia a la sequía y la resistencia a enfermedades que se confieren por asociaciones con un grupo microbiano particular pueden transmitirse de las plantas madre a su descendencia, lo que indica la importancia interrelacionada de la genética del huésped y el microbioma asociado al huésped <sup>4,8,15</sup>.

## **5. COLONIZACIÓN E INTERRELACIÓN**

Asociado a plantas los microorganismos utilizan la quimiotaxis (reacción de orientación) para detectar y responder a señales derivadas de las plantas, como los ácidos orgánicos y / o azúcares presentes en los exudados (líquidos filtrados compuestos de células, proteínas y) de las plantas, y para iniciar la colonización. Una vez que se percibe una señal, los microorganismos se mueven hacia la planta principalmente mediante el uso de flagelos <sup>19,21</sup>. Posteriormente, los microorganismos se adhieren a la superficie de la raíz y forman una biopelícula. Los genes que codifican proteínas implicadas en la quimiotaxis bacteriana, ensamblaje de flagelos, motilidad bacteriana, formación de biopelículas, secreción bacteriana y sistemas reguladores de dos componentes son muy abundantes en microorganismos y comunidades microbianas que se encuentran en el entorno de las raíces <sup>22</sup>, así como en los entornos de tallo y filosfera, en comparación con el suelo a granel <sup>15,21,22,24</sup>.

## **6. INTERACCIONES MICROBIANAS**

No es de sorprender que varios genes microbianos activos y / o enriquecidos en ambientes vegetales tengan un papel en interacciones cooperativas o competitivas con otros miembros del microbioma. Los rasgos funcionales específicos relacionados con la supresión de patógenos (por ejemplo, sistemas de secreción de proteínas y genes de biosíntesis de compuestos antifúngicos) son más abundantes en la comunidad de la rizosfera bacteriana de variedades de frijol y tomate resistentes a enfermedades que en variedades susceptibles o en suelo a granel <sup>25,26</sup>.

La detección de quórum es un mecanismo bien establecido de comunicación bacteriana de célula a célula que implica la producción y detección de moléculas de señalización (como la lactona de homoserina (HSL))<sup>27</sup>. Diferentes taxones bacterianos pueden generar el mismo tipo de molécula de señalización, lo que permite la cooperación o la interferencia (extinción del quórum) con otros taxones no relacionados. Además, las moléculas sensibles al quórum también tienen un papel en las interacciones entre reinos. La percepción de las HSL por parte de las plantas conduce a la modulación del metabolismo de la planta, la respuesta inmune y el desarrollo de las raíces <sup>27</sup>.

## **B. FUNCIÓN DE LOS MICROBIOMAS EN PLANTAS**

### **1. ADQUISICIÓN DE NUTRIENTES**

Los microbiomas asociados a las plantas tienen funciones esenciales para mejorar la nutrición de las plantas como se muestra en la Figura 1. Los mecanismos moleculares que impulsan la adquisición de nutrientes se han estudiado a fondo para simbiosis de plantas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y bacterias *Rhizobium*<sup>3,28</sup>. Además, las bacterias no simbióticas que promueven el crecimiento de las plantas pueden mejorar la biodisponibilidad de minerales insolubles o mejorar la arquitectura del sistema radicular de las plantas hospedantes, aumentando así la capacidad de exploración de la raíz en busca de agua y minerales<sup>5,28</sup>.

Los rasgos funcionales de las plantas relacionados con la adquisición o conservación de nutrientes que diferencian las especies de plantas explotadoras (de crecimiento rápido) de las conservadoras (de crecimiento lento) son aportados por su microbioma asociado<sup>7,19</sup>. Un estudio reciente mostró que las diferencias en la eficiencia del uso de nitrógeno de las variedades de arroz se deben al reclutamiento de una mayor proporción de bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno y del fósforo, lo que lleva a procesos de transformación de nitrógeno más eficientes en el entorno de las raíces<sup>30</sup>.

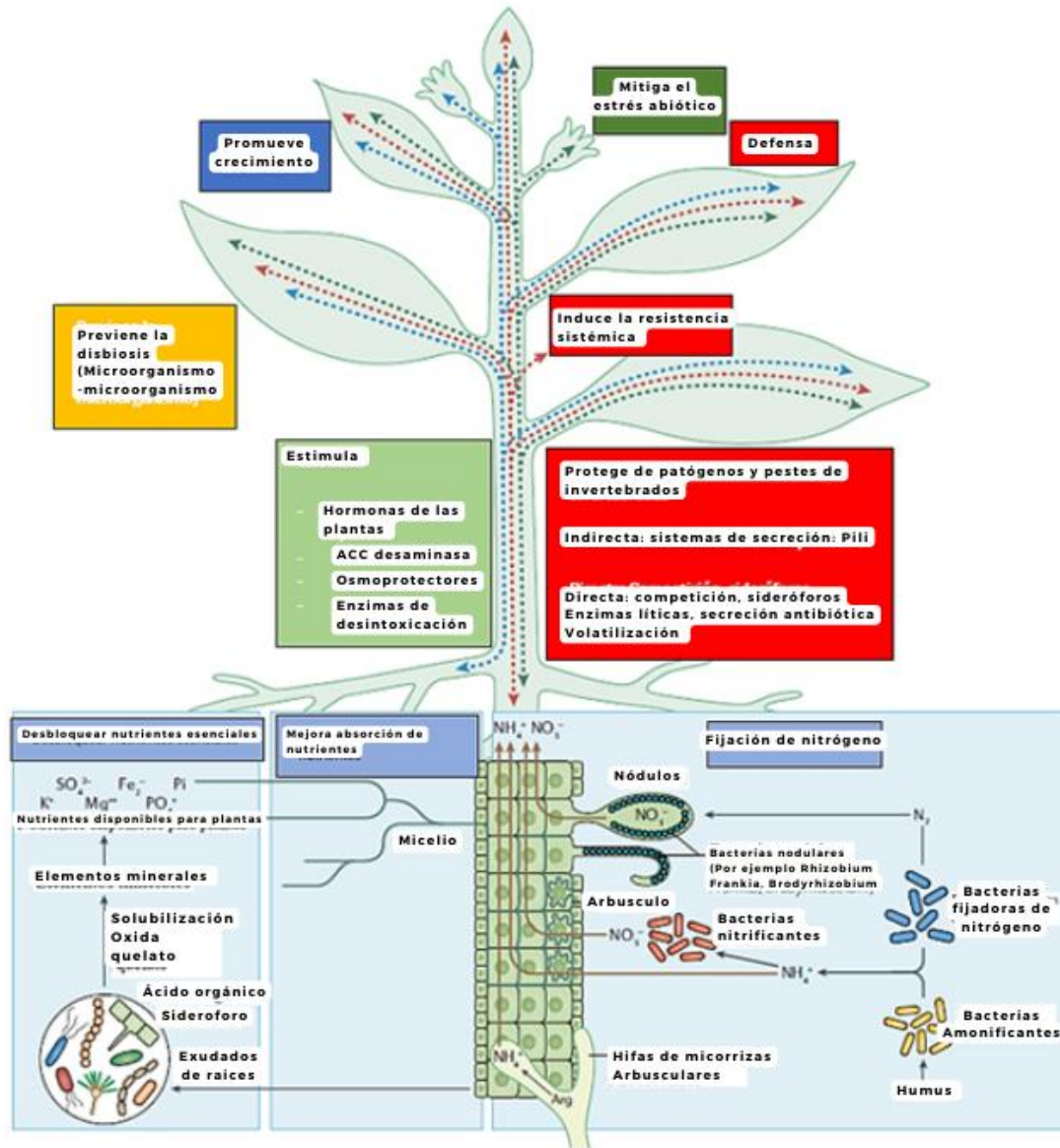


Figura 3. Adquisición de nutrientes en las plantas <sup>19</sup>.

### C. BIOTECNOLOGÍA VERDE

La biotecnología verde, también conocida como biotecnología agrícola o biotecnología vegetal, es una rama de la biotecnología que se enfoca en el uso de organismos vivos y sistemas biológicos para desarrollar soluciones sostenibles en la agricultura y la producción de alimentos. A lo largo de la historia, esta disciplina ha desempeñado un papel esencial en la mejora de cultivos, la protección de plantas contra plagas y enfermedades, y la optimización de la producción agrícola <sup>39</sup>.

### **Historia:**

La historia de la biotecnología verde tiene sus raíces en los comienzos de la agricultura, cuando los humanos comenzaron a seleccionar y cruzar plantas con características deseables. Sin embargo, el verdadero impulso se produjo en el siglo XX con el descubrimiento de la estructura del ADN y el desarrollo de técnicas de ingeniería genética en las décadas posteriores. A partir de entonces, la manipulación genética, la mejora de cultivos y la búsqueda de soluciones agrícolas sostenibles se convirtieron en pilares de la biotecnología verde <sup>39</sup>.

### **Áreas de enfoque:**

La biotecnología verde abarca diversas áreas, que van desde la modificación genética de plantas para mejorar su resistencia a plagas y enfermedades hasta la creación de cultivos más nutritivos y resistentes a condiciones adversas como sequías y suelos salinos. También se dedica al desarrollo de bioinsumos agrícolas, como los biofertilizantes y biocontroladores, que contribuyen a una producción agrícola más respetuosa con el medio ambiente y la sostenibilidad <sup>39</sup>.

### **Aplicaciones:**

Las aplicaciones de la biotecnología verde son vastas y abarcan desde la obtención de variedades de cultivos mejorados hasta la producción de alimentos funcionales. Los cultivos genéticamente modificados (GM) son un ejemplo destacado, con plantas diseñadas para resistir insectos, tolerar herbicidas o tener una mayor densidad de nutrientes. La edición genética, una técnica más reciente, permite realizar modificaciones precisas en el genoma de las plantas sin introducir genes de otras especies <sup>39</sup>.

### **Relación con los bioinoculantes:**

Los bioinoculantes, como los biofertilizantes y los biocontroladores, forman parte integral de la biotecnología verde. Estos productos biológicos utilizan microorganismos beneficiosos para mejorar la salud de las plantas y el suelo. Los biofertilizantes, por ejemplo, incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno y fósforo que promueven el crecimiento vegetal y aumentan la disponibilidad de nutrientes esenciales. Los biocontroladores, como bacterias y hongos antagonistas, ayudan a combatir plagas y enfermedades de manera más natural y sostenible que los pesticidas químicos <sup>39</sup>.

## **D. BIOINOCULANTES, ESPECIFICACIÓN Y TIPOS**

Los bioinoculantes son productos biológicos utilizados en la agricultura para mejorar la salud de las plantas, la fertilidad del suelo y la productividad agrícola de manera sostenible. Estos productos contienen microorganismos beneficiosos, como bacterias, hongos y otros organismos, que interactúan positivamente con las plantas y el entorno del suelo. Los bioinoculantes se aplican al suelo o a las plantas con el propósito de promover el crecimiento vegetal y proteger los cultivos de enfermedades y estrés ambiental <sup>39</sup>.

Los bioinoculantes se clasifican en varios tipos según su función. Los biofertilizantes, por ejemplo, son microorganismos que ayudan a fijar el nitrógeno atmosférico y solubilizar nutrientes para que las plantas puedan absorberlos más eficientemente. Los PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) son bacterias que estimulan el crecimiento de las plantas mediante la producción de hormonas y la solubilización de minerales. Los biocontroladores, por su parte, combaten plagas y patógenos, reduciendo la necesidad de pesticidas químicos.

Los bioinoculantes representan una alternativa más amigable con el medio ambiente en comparación con los métodos tradicionales de agricultura intensiva. Al mejorar la salud del suelo y de las plantas, contribuyen a la producción sostenible de alimentos y al mantenimiento de ecosistemas saludables. A medida que la agricultura busca métodos más respetuosos con la naturaleza, los bioinoculantes desempeñan un papel crucial en la promoción de la agroecología y la seguridad alimentaria.

Clasificación de los tipos de bioinoculantes:

- **Biofertilizantes:** Los biofertilizantes son microorganismos que mejoran la disponibilidad de nutrientes para las plantas al fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfatos u otros procesos que aumentan la absorción de nutrientes. Ejemplos incluyen las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrícicos.
- **Aceleradores de compost:** Estos bioinoculantes aceleran el proceso de descomposición de la materia orgánica en el compost, lo que resulta en la producción más rápida de compost de alta calidad. Microorganismos como bacterias y hongos descomponedores son ejemplos de aceleradores de compost.
- **PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria):** Son bacterias beneficiosas que colonizan la zona de las raíces de las plantas, promoviendo su crecimiento a través de la solubilización de nutrientes, la producción de hormonas vegetales y la protección contra patógenos.
- **Bioestimulantes:** Los bioestimulantes son sustancias que se aplican a las plantas para mejorar su crecimiento y desarrollo, así como su tolerancia a estrés abiótico (como sequías o salinidad). Pueden contener microorganismos beneficiosos, extractos de plantas o compuestos orgánicos.
- **Biocontroladores:** Estos microorganismos se utilizan para el control biológico de plagas y enfermedades en las plantas. Pueden incluir bacterias, hongos y otros organismos que compiten con los patógenos o los atacan directamente.
- **Biosolubilizadores:** Estos microorganismos solubilizan minerales y nutrientes en el suelo, como el fósforo, haciéndolos más disponibles para las plantas. Ayudan en la mejora de la absorción de nutrientes por parte de las raíces.
- **Biorremediadores:** Los biorremediadores son microorganismos utilizados para eliminar o reducir contaminantes en el suelo o el agua, contribuyendo a la descontaminación ambiental. Pueden descomponer contaminantes orgánicos o inmovilizar metales pesados.
- **Biofijadores:** Estos microorganismos participan en la fijación biológica de gases como el nitrógeno atmosférico. Los ejemplos más conocidos son las bacterias

fijadoras de nitrógeno que establecen simbiosis con las plantas para convertir el nitrógeno atmosférico en formas que las plantas puedan utilizar. De igual forma, las bacterias fijadoras de fósforo que establecen simbiosis con las plantas para solubilizar los fosfatos inorgánicos y los convierten en formas asimilables para las plantas.

## 1. FIJACIÓN DE FÓSFORO

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas. Aunque se encuentra en el suelo en cantidades relativamente pequeñas en comparación con otros nutrientes, su papel en la vida vegetal es crucial. El fósforo es un componente fundamental de los procesos metabólicos, la síntesis de energía y la transferencia genética, lo que lo convierte en un elemento indispensable para la supervivencia y la prosperidad de las plantas <sup>17,20,22</sup>.

- **Importancia del fósforo en las plantas:**

- Producción de energía: El fósforo es un componente clave en la molécula de adenosín trifosfato (ATP), que es la fuente de energía principal en las células vegetales. Sin ATP, la planta no podría llevar a cabo procesos esenciales como la fotosíntesis, la respiración y el transporte de nutrientes.
- Síntesis de ADN y ARN: El fósforo es un componente esencial de los ácidos nucleicos, el ADN y el ARN, que son las moléculas portadoras de información genética en las plantas. Sin fósforo, la síntesis y la transferencia de información genética serían imposibles.
- Formación de enlaces químicos: El fósforo también está presente en los fosfolípidos y en los enlaces de alta energía que conectan compuestos químicos fundamentales en las plantas. Estos enlaces son esenciales para la comunicación y la transmisión de señales entre células.

- **Fijación del fósforo en el suelo:**

A pesar de su importancia, el fósforo en el suelo suele encontrarse en formas poco disponibles para las plantas. Esto se debe a que el fósforo tiende a formar compuestos insolubles con minerales del suelo, lo que limita su absorción por parte de las raíces de las plantas. El proceso de fijación del fósforo en el suelo es un desafío que afecta la eficiencia de su utilización por las plantas. La fijación del fósforo en el suelo puede ser causada por varios factores:

- Formación de compuestos insolubles: El fósforo puede reaccionar con cationes metálicos, como el hierro y el aluminio, para formar fosfatos insolubles. Estos compuestos precipitan en el suelo, volviendo el fósforo inaccesible para las plantas.

- Afinidad con minerales: El fósforo también puede adsorberse en la superficie de minerales del suelo, como arcillas y óxidos de hierro. Esto limita su movimiento y disponibilidad para las raíces.

- **Mitigación de la fijación del fósforo:**

Para aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo, se utilizan diversas estrategias:

- Fertilización: La aplicación de fertilizantes fosfatados solubles puede suministrar fósforo directamente a las plantas. Sin embargo, esto puede ser costoso y puede contribuir a la contaminación del agua si no se maneja adecuadamente.
- Mejora del suelo: La adición de materia orgánica al suelo puede mejorar su capacidad para retener y liberar fósforo a medida que se descompone.
- Utilización de fertilizantes de liberación lenta: Estos fertilizantes liberan fósforo gradualmente a lo largo del tiempo, lo que reduce la cantidad de fósforo que puede ser fijado en el suelo <sup>17,20,22</sup>.

## 2. FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de los cultivos, y su disponibilidad en el suelo juega un papel fundamental en la producción agrícola. Aunque el nitrógeno constituye aproximadamente el 78% de la atmósfera terrestre en forma de gas diatómico (N<sub>2</sub>), esta forma no es directamente utilizable por la mayoría de las plantas. La fijación biológica del nitrógeno por parte de bacterias, especialmente las bacterias endófitas, es un proceso clave que contribuye a mejorar la disponibilidad de este nutriente esencial para los cultivos <sup>30,31</sup>.

- **Importancia del nitrógeno en los cultivos:**

- Componente de biomoléculas: El nitrógeno es un componente esencial de las biomoléculas fundamentales para la vida vegetal, como aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estas moléculas son responsables de la estructura y función celular, así como del crecimiento y reproducción de las plantas.
- Fotosíntesis y metabolismo: Las enzimas y coenzimas que participan en procesos metabólicos cruciales para el crecimiento, como la fotosíntesis y la respiración, dependen de la presencia de nitrógeno.
- Rendimiento de cultivos: La disponibilidad de nitrógeno puede influir en la producción de cultivos al afectar la cantidad y calidad de los productos cosechados. Una deficiencia de nitrógeno puede limitar el crecimiento y la formación de rendimiento.

- **Fijación biológica del nitrógeno por bacterias endófitas:**

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso mediante el cual ciertas bacterias transforman el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en formas asimilables, como amoníaco ( $NH_3$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ), que las plantas pueden utilizar <sup>30,31</sup>.

- **Mecanismo de fijación biológica del nitrógeno:**

- Bacterias fijadoras de nitrógeno: Algunas bacterias, como las del género *Rhizobium* y *Azotobacter*, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Estas bacterias establecen una simbiosis con las raíces de las plantas, en la cual las bacterias reciben compuestos orgánicos de carbono y la planta recibe nitrógeno fijado.
- Formación de nódulos: Las bacterias fijadoras de nitrógeno inducen la formación de nódulos en las raíces de las plantas leguminosas, como los frijoles y los guisantes. Estos nódulos son estructuras especializadas donde las bacterias residen y fijan nitrógeno.
- Enzima nitrogenasa: Dentro de los nódulos, las bacterias fijadoras de nitrógeno producen la enzima nitrogenasa, que convierte el nitrógeno atmosférico en amoníaco, que luego se convierte en amonio.
- Suministro de nitrógeno: El amonio generado por las bacterias se transfiere a las plantas, proporcionando un suministro constante de nitrógeno asimilable.

- **Bacterias endófitas y fijación del nitrógeno:**

Las bacterias endófitas son microorganismos que habitan en los tejidos internos de las plantas sin causar daño. Además de proporcionar otros beneficios, algunas bacterias endófitas también tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y mejorar la disponibilidad de nitrógeno para las plantas anfitrionas <sup>32,37</sup>.

Las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno tienen el potencial de ser utilizadas en prácticas agrícolas sostenibles. La inoculación de plantas con estas bacterias puede mejorar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, especialmente en sistemas agrícolas de baja fertilidad o en suelos degradados <sup>32,37</sup>.

- **Beneficios de la fijación de nitrógeno por bacterias endófitas:**

- Mejora de la nutrición: La fijación de nitrógeno por bacterias endófitas proporciona una fuente adicional de nitrógeno para las plantas anfitrionas, lo que puede mejorar su nutrición y promover su crecimiento.
- Resistencia al estrés: Se ha observado que las plantas que albergan bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno tienen una mayor resistencia a condiciones de estrés, como sequías y suelos empobrecidos, al proporcionar una fuente adicional

de nitrógeno en momentos de estrés. De esta forma, las bacterias pueden proporcionar nitrógeno extra en momentos de escasez.

- Sostenibilidad agrícola: La asociación simbiótica entre bacterias endófitas y plantas puede reducir la dependencia de fertilizantes nitrogenados sintéticos, lo que tiene beneficios ambientales y económicos al mejorar la sostenibilidad agrícola.
- Interacción beneficiosa: Las bacterias endófitas que fijan nitrógeno pueden establecer una relación simbiótica con las plantas similares a las bacterias rhizobium en las leguminosas. Esto mejora la nutrición nitrogenada de la planta, lo que a su vez puede tener efectos positivos en el crecimiento y rendimiento.

La reducción de nitrógeno a amonio llevada a cabo por bacterias de vida libre o en simbiosis con algunas especies vegetales (leguminosas y algunas leñosas no leguminosas), se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Los organismos capaces de fijar nitrógeno se conocen como diazótrofos<sup>18,30,31</sup>. Esta propiedad está restringida sólo a procariotas y se encuentra muy repartida entre los diferentes grupos de bacterias y algunas arqueobacterias. Es un proceso que consume mucha energía que ocurre con la mediación de la enzima nitrogenasa<sup>30,31</sup>.

## **E. ENZIMA NITROGENASA**

La enzima nitrogenasa es una maravilla biológica que desempeña un papel crítico en el ciclo global del nitrógeno al permitir que ciertas bacterias fijadoras de nitrógeno conviertan el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) en formas asimilables por las plantas y otros seres vivos. Esta enzima es esencial para la vida en la Tierra, ya que facilita la conversión de uno de los componentes más abundantes de la atmósfera en un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos<sup>30,31</sup>.

La nitrogenasa, formada por dos metaloproteínas, ferroproteína y molibdoferroproteína, está bastante bien conservada en todos los microorganismos fijadores. Presenta un rango de actividad extendido frente a otras moléculas que contienen triples enlaces lo que ha dado base a un práctico método de detección y medida de la capacidad fijadora, y a pensar en el posible papel detoxificador de esta enzima en el ambiente primigenio de la tierra<sup>30,31</sup>.

### **○ Estructura de la enzima nitrogenasa:**

La nitrogenasa es una enzima compleja que consta de varias subunidades con estructuras tridimensionales específicas. El centro activo de la enzima contiene hierro y molibdeno, que son cruciales para su actividad catalítica. Esta estructura tridimensional única es fundamental para su capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico y convertirlo en formas utilizable.

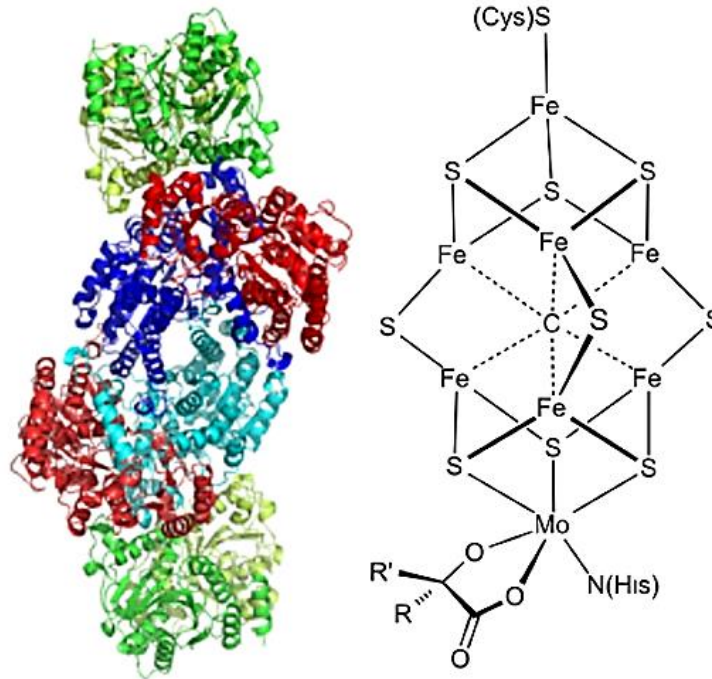


Figura 4. Estructura del cofactor FeMo de la enzima nitrogenasa.

## F. MECANISMO DE LA NITROGENASA

La enzima nitrogenasa está integrada por dos sulfo-ferro-proteínas:

- Unidad I (KP I):** llamada dinitrogenasa o molibdo-ferro-proteína está formada por 4 subunidades peptídicas con 24 átomos de Fe, 28 de S y 2 de Mo. Tiene un peso molecular aproximadamente de 300 kDa. Esta unidad constituye el sitio catalítico del  $N_2$  (ruptura del triple enlace  $N\equiv N$ )
- Unidad II (KP II):** llamada nitrogenasa reductasa es una ferro-proteína posee dos subunidades peptídicas con 4 átomos de Fe y 4 de S. Tiene un peso molecular de 60 kDa y participa en el transporte de  $e^-$  desde las ferredoxinas a la unidad I, donde se acoplan al N formando  $NH_3$

Ambas unidades de la nitrogenasa están codificadas en un gen llamado *nif* que se localiza en un plásmido de las bacterias diazótrofes. El gen *nif* es un complejo de varios genes que codifican la síntesis de ambas unidades de la Nasa (*nifD* y *nifK* para la unidad I y *nifH* para la unidad II) y otros genes que tienen funciones de regulación y control de la expresión de los genes fijadores.

La presencia de O<sub>2</sub> es el principal factor que regula la actividad de la Nasa debido a que los e- transferidos desde la ferredoxina pueden ser captados por el O<sub>2</sub> y no llegar a la unidad II de la Nitrogenasa. Además, una característica constante de la FBN es que cierta cantidad de los H<sup>+</sup> transferidos son reducidos por la Nasa antes de llegar al N y se transforman en H<sub>2</sub> (gas). La proporción de H<sub>2</sub> formado varía según la cantidad de ATP y poder reductor que tenga disponible la célula. Se menciona que con baja disponibilidad es mayor la proporción de H<sub>2</sub> y que, contrariamente, con alta disponibilidad predomina la formación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

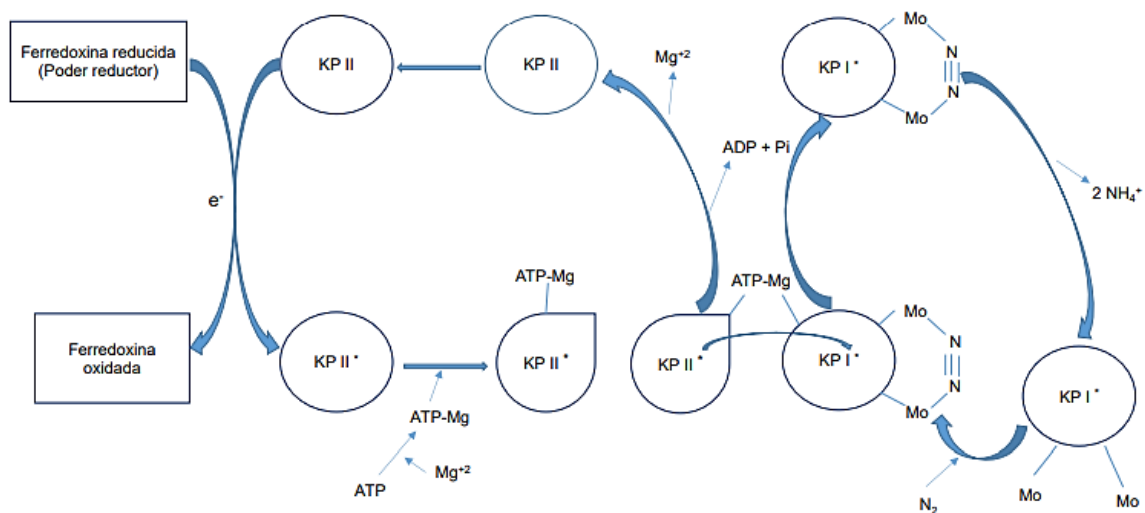
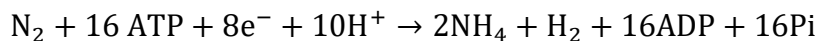


Figura 5. Mecanismo de acción de la nitrogenasa

Por este motivo se hace muy difícil poder ajustar estequiométricamente la fórmula de la FBN. La ecuación general más aceptada es:



El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> formado por fijación inmediatamente se incorpora a cadenas se incorpora a cadenas carbonadas, generalmente provenientes del ciclo de Krebs, formando aminoácidos. Los procesos más comunes son:



### 3. FUNCIÓN Y ROL EN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El proceso de fijación de nitrógeno atmosférico es altamente energético y requiere la acción de la enzima nitrogenasa para superar la triple unión estable del  $N_2$ . El ciclo de reacciones catalizadas por la nitrogenasa implica varias etapas<sup>30,31</sup>:

- Adsorción de  $N_2$ : Las bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Rhizobium* y *Azotobacter*, obtienen  $N_2$  atmosférico del suelo y lo hacen reaccionar con la enzima nitrogenasa presente en sus células.
- Reducción a amoníaco ( $NH_3$ ): La nitrogenasa facilita la conversión del  $N_2$  en amoníaco ( $NH_3$ ) a través de un proceso de reducción altamente energético. En esta etapa, se rompe la triple unión del  $N_2$  y se incorporan átomos de hidrógeno.
- Transferencia de electrones: Durante la reducción, se necesitan electrones y protones para convertir el  $N_2$  en  $NH_3$ . Estos electrones y protones son proporcionados por la enzima y transferidos dentro del complejo de la nitrogenasa.
- Activación del hidrógeno: El hidrógeno gaseoso es un subproducto de la reacción. La nitrogenasa también se encarga de activar el hidrógeno para su posterior uso en la reducción del  $N_2$ .
- Formación de amoníaco utilizable: El amoníaco producido es liberado por la enzima y puede ser incorporado en compuestos orgánicos y biomoléculas por las bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas anfitrionas.

#### ○ **Importancia y significado ecológico:**

La enzima nitrogenasa y la fijación biológica del nitrógeno son vitales para mantener la disponibilidad de nitrógeno en los ecosistemas terrestres y acuáticos. A través de la actividad de estas bacterias, el nitrógeno atmosférico se convierte en formas asimilables que las plantas pueden absorber y utilizar. Esto es especialmente crucial en suelos pobres en nitrógeno, ya que estas bacterias pueden enriquecer el suelo y mejorar la fertilidad.

#### ○ **Aplicaciones en la agricultura y la sostenibilidad:**

La enzima nitrogenasa y la fijación biológica del nitrógeno tienen aplicaciones prácticas en la agricultura sostenible. La inoculación de cultivos con bacterias fijadoras de nitrógeno puede reducir la necesidad de fertilizantes nitrogenados sintéticos, lo que a su vez disminuye el impacto ambiental y los costos para los agricultores.

## G. CICLO DEL NITRÓGENO

El ciclo del nitrógeno es un proceso continuo y complejo que ocurre en los ecosistemas terrestres y acuáticos, involucrando múltiples etapas y transformaciones químicas del nitrógeno. Estas etapas están estrechamente interconectadas y son vitales para el funcionamiento de los ecosistemas, como se muestra en la Figura 3. Aquí se explica en detalle cómo ocurre el ciclo del nitrógeno en un ecosistema <sup>30,31</sup>:

### - **Fijación del nitrógeno:**

El ciclo comienza con la fijación del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) presente en el aire. Alrededor del 78% de la atmósfera está compuesto por  $N_2$ , pero este nitrógeno no es directamente utilizable por la mayoría de los seres vivos. Algunas bacterias y cianobacterias, conocidas como fijadoras de nitrógeno, tienen la capacidad de convertir el  $N_2$  en compuestos más reactivos como amoníaco ( $NH_3$ ) o iones amonio ( $NH_4^+$ ). Estas bacterias pueden vivir en el suelo, las raíces de las plantas o incluso en los océanos.

### - **Nitrificación:**

Una vez que se han producido compuestos de amonio ( $NH_3$  o  $NH_4^+$ ), comienza la nitrificación. Las bacterias nitrificantes, como Nitrosomonas y Nitrobacter, convierten el amoníaco en nitritos ( $NO_2^-$ ) y luego en nitratos ( $NO_3^-$ ). Estos nitratos son solubles en agua y son fácilmente absorbidos por las raíces de las plantas.

### - **Asimilación de nitratos:**

Las plantas toman los nitratos del suelo a través de sus raíces y los utilizan para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes esenciales para su crecimiento y desarrollo. Los herbívoros obtienen nitrógeno al consumir plantas ricas en proteínas.

### - **Descomposición:**

Cuando las plantas y los animales mueren, sus tejidos orgánicos contienen nitrógeno. Durante el proceso de descomposición, las bacterias y hongos descomponedores descomponen estos restos y liberan compuestos nitrogenados, incluido el amoníaco, de vuelta al suelo.

### - **Desnitrificación:**

En condiciones anaeróbicas (sin oxígeno), ciertas bacterias llevan a cabo la desnitrificación. Convierten los nitratos en óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ) o nitrógeno molecular ( $N_2$ ) y lo liberan a la atmósfera. Este proceso cierra el ciclo al devolver el nitrógeno a la atmósfera en forma de  $N_2$ , completando el ciclo atmosférico.

- **Uso por organismos consumidores:**

Los consumidores primarios (herbívoros) obtienen nitrógeno al ingerir plantas ricas en proteínas. Luego, los consumidores secundarios (carnívoros) obtienen nitrógeno al alimentarse de los herbívoros. De esta manera, el nitrógeno fluye a través de la cadena alimentaria.

- **Excreción y ciclo de nuevo:**

Los organismos excretan nitrógeno en forma de urea, amoníaco o compuestos relacionados. Esta excreción introduce el nitrógeno nuevamente en el suelo, donde puede ser reciclado y utilizado por otras plantas y organismos.

- **Simbiosis bacteriana y fijación de nitrógeno:**

Las bacterias endófitas y simbióticas, como las del género *Rhizobium*, establecen asociaciones beneficiosas con las raíces de las plantas. Estas bacterias fijadoras de nitrógeno toman el  $N_2$  del aire y lo convierten en formas que las plantas pueden absorber.

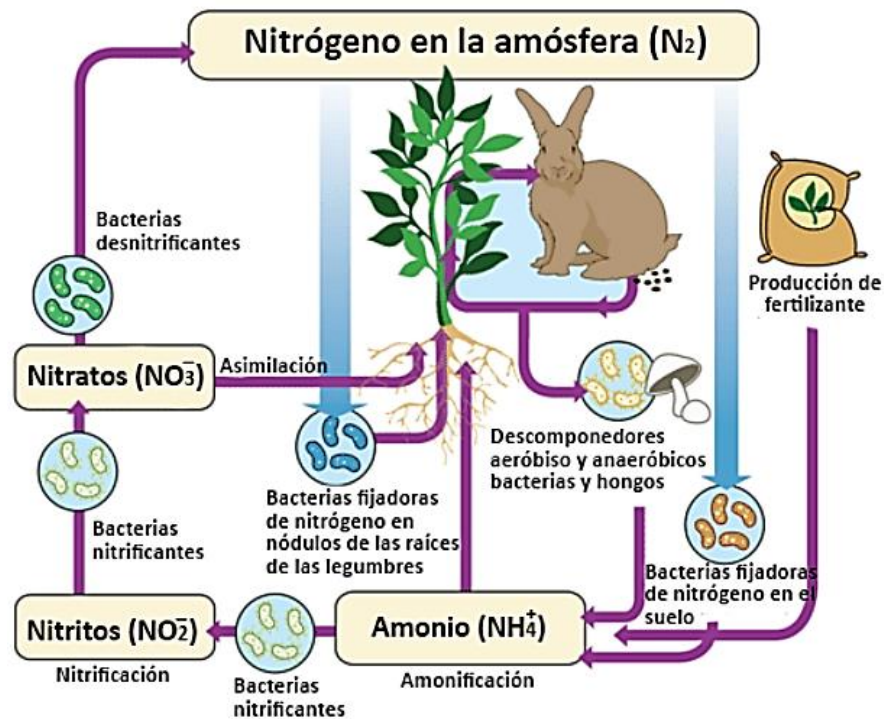


Figura 6. Ciclo del nitrógeno y su relación con los factores bióticos y abióticos.

## H. COMPUESTOS NITROGENADOS

En términos generales la importancia del uso de compuestos nitrogenados radica en la capacidad que tiene ese elemento para el desarrollo de las plantas. La fijación de nitrógeno ambiental por parte de la mayoría de las plantas es en ocasiones ineficiente lo que provoca un desarrollo lento y consecuentemente limitado. No obstante, existen excepciones como lo son las leguminosas, las cuales al estar en simbiosis con bacterias como lo serían *Rhizobium* y *Bacillus mycoides*, forman nódulos en las raíces de las plantas promoviendo así la fijación de nitrógeno y fósforo <sup>5,30,31</sup>.

De esta forma, los productos nitrogenados se enfocan en brindar nutrientes específicos para un mayor desempeño y eficiencia en el desarrollo de los cultivos. Sin embargo, dicha eficiencia no es solo el resultado visible (los frutos), si no se enfoca en cómo podemos utilizar menos recursos, aprovecharlos de mejor manera tanto el humano como los cultivos y asegurarse de no provocar alteraciones en el ecosistema <sup>2</sup>. Las alteraciones de estos productos se pueden dar por tres mecanismos: la volatilización del amoníaco (Contaminación del aire), lixiviación de nitratos (contaminación de mantos freáticos y cuerpos de agua) y la desnitrificación (gases de efecto invernadero) <sup>15,16,30,31</sup>. Estas alteraciones pueden ser corregidas mediante el uso de inhibidores de nitrificación, los cuales permiten mayor retención del nitrógeno en el suelo, así como mediante el uso de barreras físicas, las cuales suelen ser polímeros que liberan de manera gradual el nitrógeno en la tierra para un mayor aprovechamiento del mismo <sup>2,30</sup>.

### 1. MICROORGANISMOS ENDÓFITOS FIJADORES DE NITRÓGENO

El microbioma vegetal incluye las diversas comunidades que se encuentran asociadas con las plantas, incluyendo aquellas que residen dentro de sus tejidos. Las bacterias endófitas pueden habitar dentro de los tejidos vegetales sin provocar ningún daño, ya sean raíces, tallos, hojas, flores o semillas. Diversos trabajos han demostrado que las bacterias endófitas son capaces de interactuar de una manera muy eficiente con sus hospederos, comparado con aquellas que habitan la filósfera o rizósfera. De hecho, se ha propuesto a la rizósfera uno de los ecosistemas más diversos como una fuente de adquisición de endófitos para las plantas, ya que las grietas de las raíces, así como las diversas heridas de tejidos que ocurren como resultado del crecimiento de la planta, entre otros daños mecánicos, permiten a las bacterias rizosféricas penetrar y colonizar los tejidos internos <sup>18,30,31,32</sup>.

Las bacterias endófitas son microorganismos que viven dentro de los tejidos sanos de las plantas, sin causar daño aparente a sus anfitriones. Estas bacterias han desarrollado una relación simbiótica con las plantas a lo largo de la evolución, lo que significa que ambos se benefician mutuamente. Las bacterias endófitas pueden colonizar diferentes partes de la planta, como raíces, tallos, hojas e incluso semillas. En la agricultura, las bacterias endófitas ofrecen diversos beneficios a las plantas y a los cultivos. Algunas de sus funciones clave son:

- Fijación de nitrógeno: Al igual que las bacterias NFB, algunas bacterias endófitas tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en una forma utilizada

por las plantas. Esto ayuda a mejorar la nutrición de las plantas y reduce la necesidad de fertilizantes nitrogenados <sup>30,32</sup>.

- Estimulación del crecimiento vegetal: Las bacterias endófitas pueden producir compuestos promotores del crecimiento vegetal, como fitohormonas y enzimas, que estimulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estos compuestos pueden aumentar la producción de biomasa, mejorar la absorción de nutrientes y fortalecer la resistencia de las plantas a enfermedades y estrés abiótico <sup>32</sup>.
- Biocontrol de enfermedades: Algunas bacterias endófitas tienen la capacidad de combatir patógenos causantes de enfermedades en las plantas. Estas bacterias producen metabolitos antimicrobianos o inducen respuestas de defensa en las plantas, lo que reduce la incidencia y gravedad de las enfermedades <sup>32</sup>.
- Tolerancia a condiciones adversas: Las bacterias endófitas pueden ayudar a las plantas a sobrevivir y crecer en condiciones ambientales desafiantes, como sequías, salinidad del suelo o altas temperaturas. Estas bacterias pueden mejorar la capacidad de las plantas para resistir el estrés abiótico y mantener un rendimiento adecuado en condiciones desfavorables <sup>32</sup>.
- Desintoxicación de contaminantes: Algunas bacterias endófitas tienen la capacidad de degradar compuestos tóxicos o contaminantes ambientales, como pesticidas o metales pesados, lo que contribuye a la descontaminación del suelo y el agua <sup>32,33</sup>.

## **2. MECANISMO DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO POR BACTERIAS ENDÓFITAS**

- Colonización de las raíces: Las bacterias endófitas que fijan nitrógeno, como las pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, y *Herbaspirillum*, colonizan las raíces de las plantas anfitrionas. A través de procesos químicos y señales, estas bacterias son capaces de ingresar a las raíces y establecer una relación simbiótica.
- Formación de biofilms: Una vez en las raíces, las bacterias endófitas forman biofilms, que son comunidades microbianas adheridas a la superficie de las raíces. Estos biofilms proporcionan un ambiente propicio para la interacción entre las bacterias y las plantas.
- Producción de fitohormonas: Algunas bacterias endófitas producen fitohormonas, como auxinas, que estimulan el crecimiento de las raíces y mejoran la absorción de nutrientes, incluido el nitrógeno. Esto beneficia a las plantas al aumentar su capacidad para acceder a fuentes de nitrógeno en el suelo.
- Actividad enzimática: Las bacterias endófitas también poseen enzimas específicas, como nitrogenasa, que son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ) y otros compuestos asimilables. Este proceso es esencial para la fijación del nitrógeno.
- Transferencia de nitrógeno: Una vez que las bacterias endófitas convierten el  $N_2$  en formas asimilables, estos compuestos son transferidos a las plantas anfitrionas. Las

plantas utilizan estas formas de nitrógeno para sintetizar aminoácidos, proteínas y otros componentes celulares esenciales.

La utilización de bacterias endófitas en la agricultura puede ayudar a mejorar la productividad de los cultivos de manera sostenible, reducir el uso de productos químicos y promover la salud de los ecosistemas agrícolas. Sin embargo, es importante destacar que la eficacia y los beneficios específicos pueden variar dependiendo de las especies bacterianas y las condiciones de cultivo. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones y ensayos específicos para seleccionar las bacterias endófitas adecuadas y optimizar su aplicación en cada sistema de cultivo<sup>18,30,31,32</sup>.

### **3. SIMBIOSIS PLANTAS DE JITOMATE Y BACTERIAS ENDÓFITAS**

Las plantas de jitomate, pertenecientes a la especie *Solanum lycopersicum*, albergan una amplia variedad de bacterias en sus tejidos, incluidas varias especies de bacterias endófitas. Este fenómeno se debe a una serie de factores biológicos y ecológicos que interactúan en el microbioma vegetal del jitomate.

En primer lugar, la superficie de las plantas, incluidas las hojas, tallos y raíces, proporciona un entorno rico y diverso para el crecimiento bacteriano. Las hojas y los tallos proporcionan una superficie accesible para la colonización bacteriana, mientras que las raíces liberan compuestos orgánicos que pueden servir como fuente de alimento para las bacterias del suelo. Además, el jitomate, al igual que otras plantas, secreta una variedad de compuestos químicos a través de sus raíces, conocidos como exudados radiculares. Estos exudados contienen una combinación única de carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y otros compuestos que pueden atraer a ciertos tipos de bacterias y estimular su crecimiento y actividad metabólica. Algunas de estas bacterias pueden ser endófitas, lo que significa que pueden colonizar los tejidos internos de la planta sin causar daño aparente. El ambiente microscópico dentro de los tejidos de la planta también puede proporcionar condiciones favorables para el crecimiento bacteriano. Por ejemplo, el interior de los tallos y las raíces puede ofrecer protección contra condiciones ambientales adversas, como la sequía o la radiación ultravioleta, y puede proporcionar nutrientes y espacio para el crecimiento bacteriano.

Otro factor importante que contribuye a la diversidad bacteriana en las plantas de jitomate es la interacción con el suelo circundante. Las raíces de las plantas de jitomate tienen la capacidad de interactuar con las comunidades microbianas del suelo, tomando contacto con una amplia gama de bacterias presentes en el ambiente del suelo. Estas bacterias pueden colonizar las raíces de la planta y eventualmente migrar hacia los tejidos internos, contribuyendo así a la diversidad bacteriana del jitomate. Además, se ha demostrado que las bacterias endófitas pueden tener efectos beneficiosos en las plantas de jitomate, como el aumento de la resistencia a enfermedades, la mejora de la tolerancia al estrés abiótico y el aumento del rendimiento de los cultivos. Estos beneficios pueden ser el resultado de la producción de compuestos antimicrobianos, la estimulación del sistema inmunológico de la planta o la mejora de la absorción de nutrientes.

#### 4. MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN

Los métodos de secuenciación han permitido la comprensión profunda de la genética de los organismos, lo que ha llevado a avances en áreas como la medicina, la agricultura y la conservación biológica. Estos métodos continúan evolucionando, proporcionando herramientas esenciales para la exploración genómica y la comprensión de la vida en un nivel molecular. La secuenciación del ADN ha transformado la biología al permitir el análisis detallado del material genético. Diversos métodos se utilizan para esta tarea, cada uno con usos específicos, principios de funcionamiento únicos y ventajas y desventajas distintas. A continuación, se enumeran los tipos <sup>38</sup>:

##### 1. Secuenciación de Sanger:

- a. Usos: Secuenciación de genes individuales, análisis de ADN pequeños y medianos.
- b. Funcionamiento: Emplea dideoxinucleótidos marcados que detienen la elongación del ADN durante la replicación, generando fragmentos que se separan por tamaño para revelar la secuencia.
- c. Ventajas: Precisión para secuencias cortas, estándar en secuenciación de genes individuales.
- d. Desventajas: Costosa y lenta para secuencias largas, mayor error en secuencias repetitivas.

##### 2. Secuenciación de nueva generación (NGS):

- a. Usos: Secuenciación masiva y rápida de genomas completos, transcriptomas, metagenomas.
- b. Funcionamiento: Basada en la amplificación y secuenciación masiva de fragmentos de ADN, con millones de lecturas simultáneas.
- c. Ventajas: Alto rendimiento, menor costo por base, adecuado para proyectos genómicos completos.
- d. Desventajas: Posibles errores de secuenciación, requerimientos computacionales y análisis complejo.

##### 3. Secuenciación de tercera generación:

- a. Usos: Secuenciación de largas lecturas, metagenómica y ensamblaje de genomas complejos.
- b. Funcionamiento: Utiliza tecnologías como PacBio y Nanopore que secuencian hebras de ADN individuales de manera continua, generando secuencias largas.
- c. Ventajas: Lecturas más extensas, superando repeticiones y estructuras difíciles.
- d. Desventajas: Mayor tasa de error en lecturas, costos más elevados.

##### 4. Secuenciación del gen 16S rARN:

Es un método esencial en la investigación microbiológica y se centra en una región altamente conservada del ADN bacteriano que varía lo suficiente para permitir la identificación y clasificación de diferentes bacterias.

- a. Usos: Estudio de comunidades bacterianas, taxonomía microbiana, análisis de diversidad.
  - Taxonomía: Permite la identificación y clasificación de bacterias hasta niveles taxonómicos específicos.
  - Diversidad microbiana: Ayuda a entender la composición de las comunidades microbianas en diferentes entornos.
  - Epidemiología: Facilita el seguimiento y análisis de brotes y enfermedades infecciosas.
  - Ecología microbiana: Ayuda a estudiar las interacciones entre bacterias en diferentes ecosistemas.
- b. Funcionamiento: Se focaliza en la región 16S del rARN ribosomal, la cual es conservada pero variable entre bacterias.
- c. Ventajas: Amplia aplicación en microbiología, identificación precisa hasta nivel de especie, bases de datos disponibles.
- d. Desventajas: No cuantitativo, limitado a bacterias, variabilidad en regiones.

#### **5. Secuenciación del gen 18S rARN:**

- a. Usos: Estudio de eucariotas, diversidad en protistas, hongos y organismos multicelulares.
- b. Funcionamiento: Similar al 16S rARN, pero dirigido a eucariotas, usado en análisis ecológicos.
- c. Ventajas: Información sobre diversidad eucariota, relevante en ecología.
- d. Desventajas: No aplicable a procariotas, algunas regiones pueden ser difíciles de amplificar.

## V. METODOLOGÍA

### A. PREPARACIÓN DE MEDIOS

#### 1. AGAR NUTRITIVO

##### **Materiales y equipo:**

- Erlenmeyer de 1 litro
- Probeta de 500 ml
- Estufa
- Agitador magnético
- 500 ml de agua esterilizada
- Agar nutritivo
- Papel aluminio

##### **Procedimiento:**

1. Para el aislamiento de bacterias se empleó el agar nutritivo como medio para el primer aislamiento.
2. En erlenmeyer de 1 litro se agregaron 500 ml de agua destilada esterilizada y se colocó en estufa con agitador.
3. Se dejó calentando el erlenmeyer con el agua destilada esterilizada, se pesaron en la balanza 20 gramos de agar nutritivo y posteriormente se agregaron al erlenmeyer.
4. Se dejó con agitación hasta que todo el contenido de agar estuviera disuelto en el agua y se llegara al punto de ebullición.
5. Se dejó reposando para posteriormente pasar al proceso de esterilización.

#### 2. MEDIO NFB

##### **Materiales y equipos:**

- Matraz aforado de 1 litro
- 10 Beakers de 50 ml
- Balanza analítica
- Espátula analítica
- Erlenmeyer de 1 litro
- Estufa con agitador
- Agitador magnético
- Autoclave
- Agua destilada
- Ácido málico
- Glucosa

- Fosfato dipotásico solución al 10%
- Sulfato de magnesio hepta hidratado solución al 10%
- Cloruro de sodio solución al 10%
- Cloruro de calcio di hidratado solución al 1%
- Sulfato de Manganeseo
- Ácido bórico
- Sulfato de cobre Penta hidratado
- Sulfato de zinc hepta hidratado
- EDTA-Fe
- hidróxido de sodio 1N
- Sulfato de hierro hepta hidratado
- Azul de bromotimol solución 0.5%
- Hidróxido de potasio 0.2N
- Biotina
- Piridoxal – HCl
- Ácido clorhídrico
- Cloruro de amonio

**Procedimiento:**

Para el aislamiento de bacterias fijadores de nitrógeno, se empleó el medio libre de nitrógeno NFB, el cual está compuesto por una serie de componentes sólidos y disoluciones líquidas como se muestra a continuación:

1. **Pesar componentes sólidos** con ayuda de una balanza y una espátula analíticas, y agregarlos en un matraz aforado de 1 litro, aforarlo hasta llegar a los 900ml. Mezclar bien hasta disolver los componentes sólidos.
  - **Ácido málico:** 5 g/litro
  - **Glucosa:** 2 g/litro
2. Pesar y agregar al matraz aforado de 1 litro los componentes en disoluciones líquidas.
3. Realizar la solución de fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ )
  - **Fosfato dipotásico:** Pesar 0.5g en 5ml de agua destilada (5 ml de una solución al 10%), en beaker de 20ml, mezclar bien y agregar a matraz aforado.
4. Realizar solución de sulfato de magnesio hepta hidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
  - **Magnesio hepta hidratado:** Pesar 0.2 g en 2 ml de agua destilada (2 ml de una solución al 10%), en beaker de 20ml, mezclar bien y agregar a matraz aforado.
5. Realizar solución de cloruro de sodio (NaCl)

- **Cloruro de sodio:** Pesar 0.1 g en 1 ml de agua destilada (1 ml de una solución al 10%), en beaker de 20ml, mezclar bien y agregar a matraz aforado.
6. Realizar solución de cloruro de calcio di hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- **Cloruro de calcio di hidratado:** Pesar 0.02 g en 2 ml de agua destilada (2 ml de una solución al 1%), en beaker de 20ml, mezclar bien y agregar a matraz aforado.
7. Realizar solución de micronutrientes compuesta por los siguientes reactivos: molibdato de sodio di hidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ), ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), sulfato de cobre Penta hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), y sulfato de zinc hepta hidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), pesar cada uno de los componentes en recipientes plásticos separados, agregarlos a matraz aforado y mezclar bien con ayuda de una estufa con agitador y un agitador magnético hasta disolver completamente todos los componentes.
- **Molibdato de sodio di hidratado:** 0.2 g/l
  - **Sulfato de manganeso:** 0.235 g/l
  - **Ácido bórico:** 0.28 g/l
  - **Sulfato de cobre Penta hidratado:** 0.008 g/l
  - **Sulfato de zinc hepta hidratado:** 0.024 g/l
8. Realizar **solución de EDTA-Fe**
- Para preparación de EDTA-Fe:
    - Disolver 5g de EDTA, en 50 ml de agua de NaOH 1N
  - Para preparación de NaOH 1N
    - 2g de hidróxido sódico en 50 ml de agua destilada, mezclar bien.
  - Disolver 14 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 50 ml de agua destilada.
  - Agregar la solución de EDTA al total de la solución de hierro y mezclarlo en recipiente oscuro, hasta que la solución adquiera un color café cristalino.
  - Agregar 2 ml de la solución final a matraz aforado y mezclar bien.
9. Realizar **solución de azul de bromotimol** (0.5% en KOH 0.2N), y agregar 2 ml de la solución a matraz aforado y mezclar bien.
- Para solución de KOH, agregar 0.056 g de KOH en 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  en beaker de 20 ml
  - De la solución de KOH preparada anteriormente tomar una alícuota de 2ml y agregar 0.01 g de azul de bromotimol en otro beaker de 10 ml

- Agregar 2 ml de la solución a matraz aforado y mezclar bien.
10. Ajustar el pH a 5.5 con **ácido clorhídrico** (HCl) o **hidróxido de sodio** (NaOH), según sea necesario. Agregar agua destilada hasta completar el volumen final de 1 litro.
  11. Mezclar bien el medio y esterilizarlo en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
  12. Después de esterilizar el medio y dejando que llegara a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar en condiciones asépticas, agregar el **nitrógeno limitante** ya sea nitrato de amonio (0.5 – 1.5 g/ L) o cloruro de amonio (0.3 – 0.5 g/L)
  13. Después de esterilizar el medio y dejando que llegara a temperatura ambiente, en una campana previamente esterilizada y en condiciones asépticas agregar la solución de vitaminas
    - **Biotina:** 0.1g/l
    - **Piridoxal – HCl:** 0.2g/l
  14. Mantener en frío para su mantenimiento

### 3. CALDO NUTRITIVO

#### **Materiales y quipos:**

- Erlenmeyer de 1 litro
- Probeta de 500 ml
- Estufa
- Agitador magnético
- 500 ml de agua destilada esterilizada
- Caldo nutritivo
- Papel aluminio

#### **Procedimiento:**

1. Para el cultivo madre de bacterias se empleó el caldo nutritivo, el cual es un medio semisólido en el cual se colocan los explantes de las plantas.
2. En erelnmeyer de 1 litro se agregaron 500 ml de agua destilada esterilizada. Se pesaron en la balanza 4 g de polvo y se suspendieron en los 500 ml.
3. Se dejó reposando durante 5 minutos y posteriormente se puso a calentar en estufa con agitación hasta que todo el contenido del caldo estuviera disuelto en el agua y se llegara al punto de ebullición (dejar 1 a 2 minutos).
4. Se dejó reposando para posteriormente pasar al proceso de esterilización.

## **B. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN**

### **1. CRISTALERÍA**

#### **Materiales y equipos:**

- 9 erlenmeyers de 250 ml
- Autoclave
- Papel aluminio

#### **Procedimiento:**

1. Para asegurar que el proceso de extracción, inoculación e incubación de las bacterias fuese lo más estéril posible, se llevó a cabo un proceso de esterilización en autoclave.
2. Se tomaron 9 erlenmeyers de 250 ml y fueron llevados a la autoclave de la Universidad del Valle, se introdujeron en la autoclave y se configuró la misma a una temperatura de esterilización de 250 °C y tiempo de 1 hora.

### **2. MEDIOS DE CULTIVO**

#### **Materiales y equipos:**

- Erlenmeyer de 1 litro (Agar nutritivo)
- Erlenmeyer de 1 litro (Caldo nutritivo)
- Erlenmeyer de 2 litros (medio NFB)
- Autoclave

#### **Procedimiento:**

1. Para asegurar que el proceso de extracción, inoculación e incubación de las bacterias extraídas fuese lo más estéril posible, se llevó a cabo un proceso de esterilización de los medios en la autoclave.
2. Se prepararon los siguientes medios: 1 litro de agar nutritivo, 1 litro de caldo nutritivo y 1.5 litros de medio NFB.
3. Posterior a la preparación de los medios, estos fueron llevados a la autoclave de la Universidad del Valle de Guatemala, se introdujeron en la autoclave y se configuró la misma a una temperatura de esterilización de 250°C y tiempo de 1 hora.

## **C. MUESTREO**

#### **Materiales y equipos:**

- 3 recipientes plásticos
- Tierra negra
- Pala pequeña
- Bisturí

**Procedimiento:**

1. En el lugar de muestreo se realizó un muestreo aleatorio. En cada sitio se colectó 1 planta sanas con todo y raíz, en total 3 muestras.
2. Las muestras se identificaron y almacenaron para el transporte al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Valle de Guatemala y se procesaron dentro de las 24 horas después de ser colectadas.
3. De cada planta se tomaron explantes de raíz, tallo y hojas (jóvenes y adultas) para el aislamiento de microorganismos con efectos bioinoculantes y de fijación de nitrógeno (bacterias endófitas).

**D. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS****Materiales y equipos:**

- 9 cajas Petri estériles
- 9 erlenmeyer estériles
- Pinzas
- Shaker
- Incubadora
- Etanol al 70%
- Agua destilada esterilizada
- Tampón de fosfato de potasio
- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 5%
- 9 placas de agar nutritivo
- Caldo nutritivo estéril

**Procedimiento:**

1. Los explantes de las muestras recolectadas fueron sometidas a un proceso de desinfección superficial, en total se tenían 9 muestras.
2. Los explantes de raíces, tallos y hojas de cada planta se deben lavar con agua estéril y cortar en segmentos de 2 cm aproximadamente.
3. Para el proceso de desinfección se requieren de tres raíces, tres tallos y tres hojas por muestra, se colocan el conjunto de explantes de forma individual en cajas petri.
4. Para el aislamiento de bacterias endófitas, cada raíz fue sometida a proceso de esterilización superficial (Sakiyama et al., 2001).
5. El proceso se realizó en placas Petri y consistió de: dos lavados de cada explante en agua destilada esterilizada, seguida de agitación por 15 min en solución tampón de fosfato de potasio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; inmersión por 1 min en alcohol al 70%; agitación por 5 min en solución de hipoclorito de sodio 5%; nuevamente inmersión por 1 min en alcohol 70% seguida de agitación por 15 min en solución tampón fosfato de potasio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH

7,0 y, finalmente, el lavado por cuatro veces en agua destilada esterilizada. El proceso fue repetido por dos veces.

6. Para confirmar la esterilización de la superficie de las raíces, se tomó una alícuota del último lavado y fue esparcida en placa conteniendo medio de cultivo agar nutritivo e incubada a 37°C por 72 horas.
7. Seguido, los explantes fueron transferidos con ayuda de pinzas estériles para 9 erlenmeyers conteniendo caldo nutritivo e incubado a 37°C por 72 horas, para el aislamiento de bacterias endófitas cultivables.

(Metodología según, Pérez et al.,2014) <sup>32</sup>

## **E. REAISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS**

### **Materiales y equipos:**

- 9 erlenmeyers de 250ml (incubados previamente)
- Asas bacteriológicas
- 2 mecheros
- Campana de flujo laminar
- Microscopio
- 27 placas de agar nutritivo
- Reactivos para tinción de Gram

### **Procedimiento:**

1. De los 9 erlenmeyers de 250 ml y pasado el tiempo de incubación se evidenció el crecimiento de bacterias en el caldo nutritivo.
2. Se llevó a cabo el reaislamiento de las bacterias a las placas con el medio agar nutritivo.
3. Se utilizó el método de estriado en placa con ayuda de asas bacteriológicas para la obtención de colonias puras; en total se inocularán 27 placas a partir de los 9 erlenmeyers que contenían los explantes en caldo nutritivo.
4. El proceso de reaislamiento se realizó 2 veces para asegurar la obtención de colonias puras.
5. En la primera resiembra se llevó a cabo una descripción de colonias donde ya se evidenciaron colonias aisladas, de esta forma, se realizó una descripción morfológica de las 27 placas incubadas y seleccionaron colonias bien definidas para realizar nuevamente una resiembra.
6. En la segunda resiembra se obtuvieron colonias puras con diferentes morfologías las cuales fueron sometidas a tinción para identificar su morfotipo.

## **F. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO**

### **Materiales y equipos:**

- 9 tubos de ensayo estériles de 10 ml
- Asas bacteriológicas
- Mechero
- Campana de flujo laminar
- Incubadora
- 30 ml medio NFB (3 ml por tubo)
- Cajas Petri con agar nutritivo

**Procedimiento:**

1. Cada una de las colonias puras se inocularon en medios semisólidos (NFB) libres de nitrógeno, se incubaron a 37 °C, durante 7 días.
2. Los aislados capaces de crecer que formaron una película visible debajo de la superficie del medio se consideraron fijadores de nitrógeno.
3. Los morfotipos seleccionados fueron purificados y mantenidos en agar nutritivo para su posterior análisis e identificación mediante secuenciación.

## **G. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN**

**Materiales y equipos:**

- Cajas Petri con agar nutritivo (Previamente incubadas con colonias puras)
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Campana de flujo laminar
- 4 tubos eppendorf de 0.2 ml
- 1 caja petri
- Bolsa de burbuja

**Procedimiento:**

1. Se llevó a cabo la caracterización de las cepas de bacterias obtenidas mediante secuenciación del gen 16S rRNA, realizado por la empresa Coreana Macrogen, para confirmar la presencia de bacterias endófitas.
2. Para el envío de las muestras se realizó un cultivo en agar nutritivo de las colonias que presentaron actividad fijadora de nitrógeno y se dejaron incubando durante 24 hr a 37°C.
3. Pasado el tiempo con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una colonia de cada uno de los cultivos previamente realizados y se colocaron en tubos eppendorf de 0.2 ml debidamente identificados.
4. Seguido, se colocaron en una caja Petri y una bolsa de burbujas para mayor protección. El envío se realizó por medio de FedEx.

## H. PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS (PREINÓCULO)

### Materiales y equipos:

- 9 tubos de ensayo
- 3 Erlenmeyer de 250 ml
- Micropipeta de 10 ml
- Puntas de 5 ml estériles
- Mechero
- Campana de flujo laminar
- Incubadora
- Espectrofotómetro
- 450 ml de medio NFB

### Procedimiento:

1. A partir de un cultivo de 24 horas de incubación en agar nutritivo y habiendo obtenido los resultados de secuenciación se llevó a cabo el preinóculo de bacterias endófitas.
2. En 3 tubos de ensayo se agregaron 5 ml c/u de medio libre de nitrógeno NFB y se inocularon a partir del cultivo de 24 horas con ayuda de un asa bacteriológica y se dejaron incubando durante 72 horas.
3. Pasado el tiempo, se realizó el preinóculo en un Erlenmeyer de 250 ml al cual se le agregó 135ml de medio libre de nitrógeno NFB y los 15 ml de los tubos de ensayo inoculados previamente para llegar a un volumen de preinóculo de 150 ml.
4. Por medio de preinóculo se realizó la curva de crecimiento para *Bacillus thuringiensis* en el medio NFB, en la cual se tomaron alícuotas de 1ul cada 6 horas y se les leyó la absorbancia a 690nm con ayuda de un espectrofotómetro.
5. Las mediciones se realizaron hasta obtener los datos de la fase estacionaria o fase de muerte en la curva de crecimiento. Habiendo obtenido la curva de crecimiento se determinó el tiempo de duplicación de *Bacillus T.* en el medio NFB.
6. El procedimiento de propagación en los 3 tubos de ensayo y la realización del preinoculo en un erelnemeyer de 250 ml se realizó en triplicado para poder obtener 3 curvas de crecimiento para *Bacillus T.* en el medio NFB.

## I. PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS (INÓCULO)

### Materiales y equipos:

- Reactor de 1 litro
- Preinóculo
- Centrifugadora
- Pipeta volumétrica de 25 ml

### **Procedimiento:**

1. Se dispuso la totalidad del preinoculo 150 ml y se inoculo el reactor de 1 litro con los 150 ml de preinoculo y 450 ml de medio NFB para dar un volumen total de 600 ml.
2. Se establecieron las condiciones de operación del reactor: temperatura 37°C y agitación 150 rpm.
3. Se dejó fermentando durante 2 semanas y se realizaron las mediciones de fijación de nitrógeno con ayuda del kit de hach y de biomasa mediante una pipeta volumétrica y la centrifugadora.

## **J. MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE *BACILLUS T.* UTILIZANDO EL MÉTODO DE MEDICIÓN DE NITRÓGENO TOTAL DEL KIT DE HACH**

### **Materiales y equipos:**

- Reactivos A, B y C Kit de Hach
- Micropipeta de 100 µL
- Puntas de 5 ml estériles
- Erlenmeyer de 150 ml estéril
- Pipeta volumétrica de 5 ml
- Gradilla
- Kimwipes
- Digestor
- Colorímetro DR/890
- Agua destilada
- Muestra de Inóculo del reactor de 1 L

### **Procedimiento:**

Para la medición del nitrógeno atmosférico fijado por *Bacillus T.* en el reactor de 1 L se siguió la metodología de medición de nitrógeno total del kit Hach, método 10071. El cual se resumen en los siguientes pasos:

1. **Encendido de digestor:** Encender el digestor y programarlo para su precalentamiento hasta 105°C.
2. **Preparación de blanco y muestra:** Agregar un sobre de persulfato a cada uno de los tubos y agregar 2 ml de agua destilada al blanco y 2ml de la muestra a analizar al otro tubo de ensayo, y agitar durante 30 segundos. Identificar debidamente ambos tubos de ensayo.
3. **Digestión:** Colocar los dos tubos de ensayos y calentar durante 30 min a 105°C, pasado el tiempo dejar reposando hasta que ambos tubos lleguen a temperatura ambiente.
4. **Adición de reactivo A:** Quitar las tapas a ambos tubos de ensayo y agregar a cada uno de ellos un sobre del reactivo A, luego cerrar los tubos y agitarlos

durante 15 segundos. Seguido a la agitación, tomar tiempo ya que iniciara una reacción de 3 minutos.

5. **Adición de reactivo B:** Quitar las tapas a ambos tubos de ensayo y agregar a cada uno de ellos un sobre del reactivo B, luego cerrar los tubos y agitarlos durante 15 segundos. Seguido a la agitación, se debe tomar tiempo, ya que, iniciara una reacción de 2 minutos.
6. **Adición de reactivo C:** De los tubos con los reactivos A y B previamente digeridos, se debe de tomar una alícuota de 2 ml por tubo y se agregan a los dos tubos de ensayo que contienen el reactivo C. Seguido, se cierran los nuevos tubos de ensayo con el reactivo C y se realizan 10 inversiones con movimientos lentos y sutiles. Después de realizar las inversiones, se debe tomar el tiempo, ya que, iniciara una reacción de 5 minutos.
7. **Preparación de colorímetro DR/890:** Mientras se lleva a cabo la reacción de 5 minutos, insertar adaptador COD/TNT en el orificio de la celda y rotarlo hasta que case en su lugar.
8. **Configuración colorímetro DR/890:** Acceder al programa almacenado por medio del botón (PRGM 7), seguido selecciona (58) y (ENTER). La pantalla mostrara mg/L y el icono de (ZERO).
9. **Medición de blanco:** Pasado los 5 minutos de reacción tomar el tubo de ensayo del blanco y con ayuda de un Kimwipe limpiar suavemente para eliminar cualquier huella presente. Ubicar el blanco en el orificio de celda hasta que se introduzca completamente y cubrirlo con la tapa del instrumento. Seguido, presionar el botón (ZERO), la pantalla mostrara 0.0 mg/L N.
10. **Medición de la muestra:** Retirar el blanco del orificio de celda, y con ayuda de un kimwipe limpiar suavemente el tubo de ensayo que contiene la muestra e introducirlo en el orificio de celda. Seguido, cubrirlo con la tapa del instrumento y presionar el botón (READ), la pantalla mostrará el resultado del N total en mg/L.
11. **Medición en caso de “LIMIT”:** En caso de que se sobrepase el rango de medición se deberá de diluir la muestra en una proporción  $10^1$  (10 ml de agua destilada, por 1 ml de solución de tubo de ensayo que contiene la muestra y el reactivo C. Una vez llevada a cabo la dilución se debe de calentar el nuevo tubo de ensayo diluido en el digestor, durante 30 min a 105°C. Posteriormente, seguir los pasos del 8 al 10.

Esta medición se llevó a cabo al inicio de la inoculación en el reactor de 1 L en triplicado, a la mitad del periodo de fermentación en triplicado y al final del periodo de fermentación en triplicado. La cantidad de nitrógeno atmosférico fijado por *Bacillus thuringensis* será la resta entre la medición inicial y final de nitrógeno leído en el kit de hach.

## VI. ANTECEDENTES

En 2018, Galeana-Magdalena *et al.*, realizaron un estudio sobre la diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano en el Estado de Michoacán, México. Se utilizó la secuenciación de los genes 16S rDNA para caracterizar las comunidades bacterianas y se determinó que algunas de estas bacterias tienen la capacidad potencial para promover el desarrollo vegetal. El estudio sugiere que estas bacterias pueden mejorar la salud y el rendimiento de las plantas de arándano. Se proporcionan detalles específicos sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal encontradas en las bacterias endófitas, sin embargo, no se da información sobre cómo se puede utilizar esta información para mejorar la producción de arándanos. Tampoco se menciona si existen otras variedades de plantas que puedan beneficiarse de la presencia de estas bacterias endófitas. Por otro lado, se logró evidenciar que algunas cepas de *Bacillus* y *Pantonea* mostraron mejor producción de fitohormonas (AIA), biofilm y sideróforos comparados con el control positivo que en ese caso fue la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* UM270.

Otra investigación realizada en 2020, Ariaza-Sebastián *et al.*, realizaron un estudio sobre la evaluación del efecto de microorganismos fijadores de nitrógeno en el crecimiento de plantas modelo en suelo degradado. El estudio se realizó en suelo franco-arcilloso, con alta densidad aparente, baja cantidad de materia orgánica, pH fuertemente ácido y baja población de microorganismos. Se lograron aislar 23 microorganismos compatibles con fijadores biológicos de nitrógeno libre cuyo potencial biotecnológico puede aprovecharse en el estudio de sus capacidades como promotores del crecimiento vegetal. De los microorganismos aislados se logró evidenciar que la mayoría de estos sí tiene un efecto positivo en la promoción del crecimiento vegetal, siendo el aislado *Azotobacter vinelandii* el que promovió un mayor desarrollo radicular del cultivo de maíz y una mejora en la fijación de nitrógeno, hecho influenciado por las dinámicas de los bioinoculantes en este caso las PGPR.

Otra investigación realizada en 2014, Ivo-José *et al.*, evidenciaron que durante varios años se ha procedido al aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofos utilizando diversas formulaciones de medios semisólidos libre de nitrógeno. Sin embargo, las estrategias empleadas para llevar a cabo dicho aislamiento y las recetas de los medios correspondientes se encuentran dispersas en la literatura publicada y en otras fuentes que a menudo son de difícil acceso y no siempre se pueden recuperar. Esta dispersión y falta de accesibilidad han generado una necesidad evidente de consolidar dichos métodos y recetas en un conjunto coherente y accesible de información. En consecuencia, el propósito fundamental de su investigación consistió en recopilar las distintas estrategias y formulaciones, con el fin de proporcionar una guía metodológica integral y un recurso utilizable para la comunidad científica. Este recurso se ha diseñado específicamente para aquellos que trabajan en el campo de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), con un enfoque particular en las plantas no leguminosas.

Aunque las investigaciones brindan información sobre los organismos diazótrofos o mejor conocidos como bacterias endófitas y algunas técnicas de aislamiento para las mismas

y de sus posibles beneficios como promotores del crecimiento vegetal, no se ha informado previamente el uso de bacterias endófitas para promover el crecimiento de cultivos en Guatemala. Además, no se han encontrado investigaciones nacionales que cuantifiquen el rendimiento de nitrógeno atmosférico fijado por las bacterias endófitas. Del mismo modo, no existen guías detalladas para preparar el medio de cultivo NFB sin nitrógeno, además que existe muy poca literatura que se enfoque específicamente en el género *Bacillus*, y más concretamente en la bacteria *Bacillus thuringiensis*, para evaluar su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico y cuantificar su rendimiento de fijación.

## VII. RESULTADOS

### A. EVALUACIÓN DE CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO

Tabla 1. Actividad fijadora de nitrógeno de colonias aisladas

<i>No. de colonia</i>	<i>Descripción</i>	<i>Actividad fijadora de N<sub>2</sub></i>
1	MX1 Raíz	+
4	MX1 Hojas	+
6	MX1 Tallo	-
7	MX2 Tallo	+
8	MX2 Tallo	-
10	MX2 Hojas	-
11	MX2 Raíz	-
12	MX3 Hojas	+
15	MX3 Tallo	-

*Se muestran los resultados obtenidos tras haber inoculado con cada una de las colonias en tubos de ensayo de 2ml. Los tubos contenían 1.5 ml de medio NFB (libre de nitrógeno), para evidenciar el potencial para fijar nitrógeno atmosférico de las colonias aisladas. Según los resultados obtenidos se observa que de las nueve colonias aisladas únicamente las colonias 1,4,7 y 12 presentaron potencial para fijar nitrógeno atmosférico. Las demás colonias no mostraron capacidad para fijar nitrógeno atmosférico como se muestra en la sección de anexos (Fig. 27).*

## B. CARACTERIZACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

Tabla 2. Identificación estándar 16S rRNA

<i>Tema</i>						<i>Puntaje</i>		<i>Identidades</i>	
Adhesión	Descripción	Longitud	Inicio	Final	Cobertura	bit	Valor - E	Match/total	Pct,(%)
CP021061.1	<i>Bacillus Thuringiensis</i>	5427594	5350098	5351589	0	2743	0.0	1490/1492	99
CP021061.1	<i>Bacillus Thuringiensis</i>	5427594	88814	90298	0	2736	0.0	1484/1485	99

*Se muestran los resultados de la secuenciación realizada para las colonias analizadas por medio del servicio que brinda la empresa coreana Macrogen (Sección de Anexos, figura 30 y 32). Se logro llevar a cabo la secuenciación, la cual indica la presencia de la bacteria Bacillus Thuringiensis. Entre los genes que se amplifican para la identificación de especies bacterianas se encuentra el 16S ARN ribosomal (ARNr). Este gen es un marcador molecular que está compuesto de regiones variables y conservadas que se pueden amplificar mediante PCR para la diferenciación de especies. Descripción de los valores: Pct (%); El porcentaje más alto de identidad para un conjunto de alineaciones. Match/total; la puntuación más alta de alineación calculada a partir de la suma de los nucleótidos que coincidieron y los que no. La suma de los punteos de alineamientos para una misma secuencia. Valor -E; Número de alineaciones que se dieron por casualidad. Da una estimación de la significancia de la coincidencia de la secuencia introducida con la más similar de la base de datos. Cuanto menor sea el valor, menor es la probabilidad que se haya identificado al azar o por casualidad.*

**C. CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO FIJADO POR  
BACILLUS THURINGIENSIS EN REACTOR DE 1 LITRO**

Tabla 3. Evaluación de rendimiento de fijación

<i>Medición</i>	<i>Toma</i>	<i>N<sub>2</sub> total (mg/L)</i>	<i>Promedio (mg/L)</i>	<i>Incertidumbre (±)</i>
Inicial	1	6.7	9.15	± 0.5
	2	9.15		
	3	11.6		
Media	1	18.1	17.2	±0.5
	2	15.6		
	3	17.9		
Final	1	23.3	24.3	± 0.5
	2	25.5		
	3	24.0		
<i>Total, Nitrógeno atmosférico fijado</i>			<i>((Final-inicial)- N<sub>2</sub> limitante)</i>	<i>15.147 ± 0.707</i>

*Se evidencian los resultados de la medición de nitrógeno atmosférico fijado por la colonia de bacterias del género Bacillus thuringiensis en un fermentador de 1L para la cuales con ayuda del Kit de Hach se realizó la medición inicial, media y final en triplicado de su capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico dada en mg/L. Se obtuvo un rendimiento final de fijación de nitrógeno de 15.147 mg/L, por medio de la resta entre el promedio de la medición final con el promedio de la resta de la medición inicial, menos la cantidad del nitrógeno limitante que en este caso fue cloruro de amonio.*

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La escasez y los altos precios de los fertilizantes en todo el mundo han impactado en la producción agrícola a lo largo de los tres últimos años, afectando la sostenibilidad de la agricultura y la liquidez de los productores agrícolas. Es por esto que la búsqueda de bacterias fijadoras de nitrógeno es una de las estrategias emergentes en la agricultura, ya que la deficiencia de dicho compuesto conduce a una mayor dependencia de fertilizantes inorgánicos ricos en nitrógeno. De esta forma, y para brindar un acercamiento a esta tecnología en Guatemala se propuso aislar bacterias endófitas con potencial para fijar nitrógeno atmosférico, para posteriormente caracterizar las cepas aisladas y evaluar su rendimiento de fijación de nitrógeno atmosférico.

Como primer paso, se procedió al aislamiento de las bacterias endófitas mediante un proceso de esterilización superficial de las muestras recolectadas, como se detalla en la Figura 10 adjunta en la sección de anexos. Las muestras empleadas en este proceso correspondieron a plantas jóvenes de jitomate silvestre debido a la diversidad de bacterias endófitas que han sido previamente identificadas en esta planta herbácea. Las variedades silvestres de jitomate, que han evolucionado en una variedad de hábitats naturales, tienden a tener una mayor diversidad genética y una mayor capacidad para interactuar con una amplia gama de microorganismos en el suelo. Como resultado, estas plantas pueden albergar una mayor diversidad de bacterias endófitas en comparación con las variedades cultivadas según Longoria et al., 2020. El proceso se inició con la selección de los explantes, eligiendo explantes aparentemente sanos y jóvenes de la raíz, tallo y hojas de las tres plantas de jitomate seleccionadas. Una vez recolectados, estos explantes se sometieron a un riguroso proceso de desinfección superficial utilizando agua destilada estéril con el fin de asegurarse de eliminar cualquier tipo de contaminante o suciedad no deseada. Para llevar a cabo el aislamiento de las bacterias endófitas, se procedió al proceso de esterilización superficial utilizando una secuencia de soluciones que incluyeron agua destilada esterilizada, alcohol al 70%, solución tampón de fosfato de potasio e hipoclorito de sodio al 5%. Este procedimiento fue diseñado meticulosamente para garantizar la eliminación de cualquier microorganismo superficial no deseado. Es importante destacar que la esterilización se enfoca en la superficie de los tejidos vegetales, ya que las bacterias endófitas residen exclusivamente en el tejido interno de las plantas. Además, que las plantas de jitomate silvestre seleccionadas se encontraban libres de cualquier tipo de biofertilizante o biopesticida que pudiera influir en su microbiota común.

Por lo tanto, los componentes utilizados en el proceso de esterilización cumplen funciones específicas en este contexto. El tampón de fosfato de potasio, por ejemplo, desempeña un papel crucial al mantener el pH estable en la solución, ya que numerosos procesos bioquímicos y enzimáticos son sensibles al pH. Además, esta solución presenta una concentración de sal similar a la de las células vegetales, minimizando así el estrés osmótico en los tejidos vegetales. El alcohol isopropílico o etanol al 70% tiene la función de reducir significativamente la carga microbiana en la superficie de los tejidos vegetales, lo que contribuye a su esterilización efectiva y reduce el riesgo de contaminación durante la siembra en medios de cultivo o cualquier otra manipulación. Por último, el hipoclorito de sodio al 5%

actúa como un potente agente desinfectante, eliminando una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y virus, que podrían estar presentes en la superficie de los tejidos vegetales. Cabe mencionar después de estos procesos de esterilización, se realiza un enjuague con agua destilada esterilizada para asegurar que no queden residuos de detergentes o desinfectantes, lo que garantiza la obtención de bacterias endófitas de manera efectiva. Además, que toda la cristalería e instrumentos fueron sometidos de igual forma a un proceso de esterilización para así evitar posibles fuentes de contaminación cruzada, asegurando así la obtención de bacterias provenientes exclusivamente de los tejidos internos de los explantes.

Es relevante destacar que la gran mayoría de las plantas albergan una diversidad de bacterias, incluyendo aquellas que residen internamente en sus tejidos, conocidas como bacterias endófitas. Con el objetivo de obtener exclusivamente estas últimas, se implementó el protocolo de desinfección previamente detallado, destinado a eliminar cualquier microorganismo superficial presente en los tejidos de los explantes utilizados. Estas bacterias endófitas pueden ser identificadas en momentos específicos en los tejidos de plantas que, en apariencia, gozan de buena salud. Tienen la capacidad de colonizar varias partes de la planta, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes celulares y los vasos del xilema en el apoplasto. Algunas de estas bacterias pueden incluso establecerse en los órganos reproductores de la planta, como flores, frutos y semillas. Estas bacterias generan infecciones discretas dentro de los tejidos de las plantas y permanecen allí durante la mayor parte o incluso la totalidad de su ciclo de vida. Luego de completar el proceso de desinfección y la incubación en caldo nutritivo, se procedió a la obtención de colonias bacterianas, como se ilustra en la Figura 10 adjunta en la sección de anexos. De las nueve cajas Petri sembradas a partir de los erlenmeyers incubados, se lograron aislar 17 colonias bacterianas con diferencias morfológicas aparentes, cada una de las cuales fue posteriormente resembrada de manera individual.

Para obtener colonias puras, se llevó a cabo una descripción morfológica detallada de las colonias, como se presenta en la Tabla 6 adjunta en la sección de anexos. Esta descripción consideró aspectos como forma, borde, elevación, superficie, consistencia, aspecto, color, tamaño y tinción de Gram. Para la muestra 1 (MX1), se aislaron un total de 6 colonias: tres de la raíz, dos de las hojas y una del tallo. En el caso de la muestra 2 (MX2), se aislaron 5 colonias en total: una de la raíz, dos del tallo y dos de las hojas. Respecto a la muestra 3 (MX3), se obtuvieron 6 colonias en total: una de la raíz, dos del tallo y dos de las hojas. De este modo, se determinó que, en las muestras de jitomate utilizadas, se obtuvo un mayor número de colonias en los tallos y las hojas (6 colonias cada una) en comparación con las raíces, en las cuales se aislaron 5 colonias. Aunque no existe una diferencia considerable, se puede atribuir esta diferencia significativa al hecho de que, por lo general, las raíces albergan bacterias nodulares como *Rhizobium*, que forman nódulos en el sistema radicular de algunas plantas y para este contexto casi no se evidenciaron nódulos. En este caso, al llevar a cabo el protocolo de desinfección, se obtuvo una mayor cantidad de bacterias endófitas, que prevalecen en las hojas y tallos de las plantas. Tras la descripción morfológica, se sometió los morfotipos aislados a la tinción de Gram, lo que resultó en la identificación de 7 colonias

Gram positivas y 9 colonias Gram negativas. Con el fin de confirmar la pureza de estas colonias, se realizó un último sembrado en placa. Se seleccionaron todas las colonias Gram positivas y dos colonias Gram negativas que mostraban diferencias en relación con las demás. Esta selección se llevó a cabo como medida precautoria, ya que era altamente probable que la mayoría de las colonias Gram negativas aisladas pertenecieran a la familia de las bacterias nodulares, como *Rhizobium*, o incluso pudieran ser bacterias patógenas.

Para proseguir con la selección y posterior caracterización, se realizó la evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno de las colonias seleccionadas, tal como se presenta en la Tabla 1 de la sección de resultados. Se eligieron 9 colonias, de las cuales únicamente 4 colonias gram positivas exhibieron una actividad fijadora de nitrógeno positiva. Estas colonias corresponden específicamente a la colonia 1 de la Mx1, proveniente de la raíz; la colonia 4 de la Mx1, proveniente de las hojas; la colonia 7 de la Mx2, proveniente de los tallos; y la colonia 12 de la Mx3, proveniente de las hojas. La medición de la actividad de fijación de nitrógeno se llevó a cabo empleando el medio NFB (Medio Libre de Nitrógeno), que constituye un medio selectivo diseñado para el aislamiento de bacterias con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

El principio de acción del medio NFB se enfoca en la restricción deliberada de las fuentes externas de nitrógeno en el medio de cultivo. Para lograr esta restricción, se introdujo una fuente de carbono que no está relacionada con la fijación de nitrógeno, como un azúcar, al mismo tiempo que se eliminaron por completo las formas de nitrógeno inorgánico o compuestos nitrogenados que pudieran estar presentes en el medio. El propósito fundamental de esta metodología radica en inducir a las bacterias a depender exclusivamente de la fijación de nitrógeno atmosférico como su única fuente de nitrógeno disponible, dado que no existe nitrógeno aparte del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) presente en el aire. Como resultado de esta restricción, se promueve el crecimiento selectivo de bacterias con la capacidad metabólica de capturar nitrógeno molecular ( $N_2$ ) del aire y convertirlo en formas asimilables, como el amoníaco ( $NH_3$ ) o los nitratos ( $NO_3^-$ ), necesarios para respaldar su crecimiento y sus procesos metabólicos. La confirmación de la actividad fijadora de nitrógeno positiva se logró observando turbidez en el medio, lo que indica el crecimiento de las bacterias en el mismo, como se ilustra en las figuras 29, 30, 31 y 32 de la sección de anexos. Este resultado condujo al proceso anterior de caracterización de las colonias seleccionadas y purificadas.

La Tabla 2 de la sección de resultados presenta los hallazgos derivados de la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal de las cepas bajo análisis. A pesar de la diversidad de técnicas disponibles para la clasificación bacteriana, se optó por la secuenciación del gen 16S ARNr (ácido ribonucleico ribosomal 16S) como método principal. Esta elección se basa en la amplia disponibilidad de bases de datos especializadas que almacenan secuencias de ARNr 16S, así como en la superioridad de este método en términos de velocidad y precisión en comparación con las técnicas convencionales. Además, se destaca por su capacidad para identificar cepas que pueden resultar difíciles de cultivar en un entorno de laboratorio. A nivel molecular, permite la identificación de bacterias con fenotipos idénticos. Es importante destacar que el ARNr 16S se asocia con un complejo de 19 proteínas para formar la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Este componente es codificado por el gen 16S rRNA, el cual

se encuentra presente en todas las bacterias y exhibe una alta conservación debido a su papel fundamental en la construcción del ribosoma. No obstante, el gen 16S rRNA también contiene regiones variables que funcionan como características distintivas específicas de cada especie. Estas cualidades han consolidado al gen rRNA 16S como un segmento genético óptimo para la identificación, comparación y clasificación filogenética de bacterias.

Para llevar a cabo la identificación y caracterización de los cuatro morfotipos purificados y seleccionados, se empleó el servicio de secuenciación proporcionado por la empresa Macrogen. En este proceso, se definió la región de interés y se establecieron los cebadores de secuenciación junto con sus secuencias correspondientes. Para las muestras N3 y N4, se utilizaron los siguientes cebadores de secuenciación: 785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3' y 907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'. Asimismo, se nombraron y especificaron las secuencias de los cebadores de PCR utilizados para ambas muestras: 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' y 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'. A partir de los datos resultantes de la secuenciación, se logró identificar cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, específicamente la especie *Bacillus thuringiensis*, para las muestras N3 y N4. Esta determinación se basó en valores como el E-Value, Bit, match/Total y Pct (%), los cuales se detallan en las figuras 33 y 35 de los anexos. La validez de esta caracterización se sustenta en los valores obtenidos, comenzando por el E-Value, que indica el número de alineaciones que podrían haber ocurrido por casualidad, y que en ambos casos fue de 0. Este valor también proporciona una medida de la significancia de la coincidencia de la secuencia analizada con las entradas en la base de datos; por lo tanto, cuanto menor sea el valor del E-Value, menor es la probabilidad de que la identificación sea producto del azar. Adicionalmente, el valor del match/Total indica la puntuación más alta de alineaciones, calculada como la suma de los nucleótidos coincidentes y los no coincidentes. Por último, y de especial relevancia, el porcentaje de identidad (Pct (%)) señala el grado de similitud entre un conjunto de alineaciones, el cual fue del 99% en ambos casos. Este resultado confirma de manera concluyente la identidad de las bacterias como *Bacillus thuringiensis*.

Como parte de los resultados de la secuenciación, se ha generado un árbol filogenético que representa la relación entre las bacterias secuenciadas, tal como se ilustra en las figuras 33 y 35 adjuntas en anexos. El objetivo principal de esta representación es determinar la línea evolutiva de la especie identificada, lo que ha llevado a determinar que *Bacillus thuringiensis*, la especie en cuestión se ubica taxonómicamente en el reino de las bacterias, dentro de la familia Bacillaceae y el género Bacillus. Además, se ha establecido afinidad genética con otras especies bacterianas notables, como *Bacillus cereus* (gi: NR\_115714, NR\_074540, NR\_112630, NR\_113266 y NR\_115526), *Bacillus wiedmannii* (gi: KU198626), *Bacillus toyonensis* (gi: NR\_121761) y otras cepas de *Bacillus thuringiensis* (gi: NR\_114581, NR\_112780 y NR\_043403). Es relevante destacar que la secuenciación del ARNr 16S ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo del proyecto conocido como "Árbol de la Vida Universal" (All-Species Living Tree Project). Este proyecto ha emergido como un recurso esencial para la comprensión de las relaciones filogenéticas entre procariontes y ha

sido estructurado de manera accesible en bases de datos dinámicas, que recopilan y mantienen datos procedentes de todas las secuencias disponibles de ARNr 16S.

Siguiendo con el procedimiento, después de la identificación de la bacteria endófito aislada, se procedió a evaluar su capacidad de fijación de nitrógeno. Esta evaluación se llevó a cabo utilizando la bacteria *Bacillus thuringiensis* en un medio libre de nitrógeno (NFB) en un reactor de 2 litros. El experimento se realizó bajo condiciones controladas, manteniendo una temperatura de 37°C, una agitación a 150 rpm y un período de fermentación de 2 semanas, como se muestra en la Figura 37 de la sección de anexos. En la Tabla 3, ubicada en la sección de resultados, se presentan los datos obtenidos durante la cuantificación de nitrógeno atmosférico fijado por la bacteria. Estas mediciones se realizaron de manera triplicada, abarcando mediciones iniciales, intermedias y finales. Como era de anticipar, se observó un aumento en la cantidad de nitrógeno fijado a medida que transcurría el tiempo. Este aumento se explica por la estrategia de inducir a las bacterias a depender exclusivamente de la fijación de nitrógeno atmosférico como su única fuente de nitrógeno disponible.

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram-positiva que destaca por su capacidad para producir cristales de proteínas tóxicas para insectos, conocidas como delta-endotoxinas o toxinas Bt. Estas toxinas desempeñan un papel crucial en la agricultura, ya que se emplean como pesticidas biológicos selectivos que proporcionan un control efectivo de plagas sin ocasionar daño a seres humanos, animales o plantas no objetivo. Esta característica de especificidad es esencial en la gestión sostenible de plagas, ya que reduce la dependencia de pesticidas químicos perjudiciales para el medio ambiente. En relación con las bacterias endófitas, Bt puede considerarse un ejemplo de cómo las bacterias pueden coexistir y beneficiar a las plantas hospederas. A pesar de que no es una bacteria endófito típica, ya que generalmente se encuentra en el suelo, algunos estudios han explorado su capacidad para colonizar plantas de manera endofítica y conferir resistencia a insectos a las plantas huéspedes. Esto resalta la versatilidad de las interacciones microbianas en el reino vegetal, donde tanto las bacterias endófitas como las no endófitas pueden desempeñar un papel en la protección de las plantas contra plagas. En cuanto a la fijación biológica de nitrógeno (FBN), es importante destacar que *Bacillus thuringiensis* no es conocido por su capacidad para llevar a cabo este proceso. La FBN es un fenómeno específico en el cual ciertas bacterias, conocidas como bacterias fijadoras de nitrógeno, transforman el nitrógeno atmosférico en una forma utilizable, generalmente amoníaco, que las plantas pueden absorber. A diferencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno, Bt es más conocido por su producción de toxinas Bt y su aplicación en la agricultura como agente de control de plagas. Sin embargo, investigaciones recientes han señalado la capacidad de fijación de nitrógeno por parte de diazotrofos heterótrofos, revelando que la mayoría de las especies analizadas capaces de llevar a cabo la FBN pertenecían al género *Bacillus*, según el estudio de *Yousuf et al.* (2017). Estos hallazgos respaldan la noción de que, a pesar de que Bt es conocida principalmente por su producción de endotoxinas, no se ha negado su potencial como endófito, lo que sugiere una posible diversidad funcional dentro de este género bacteriano.

La cuantificación del nitrógeno atmosférico fijado por la bacteria se realizó mediante el método de nitrógeno total del Kit de Hach. Este método se basa en una digestión con

persulfato alcalino que transforma todas las formas de nitrógeno presentes en la muestra en nitrato. Posteriormente, se añade metabisulfito de sodio para eliminar posibles interferencias de óxido halógeno. En condiciones altamente ácidas, el nitrato reacciona con el ácido cromotrópico, lo que conduce a la conversión de los anillos de bifenilo de múltiples ubicaciones en nitrato, formando diversos productos nitrados. La cuantificación de estos productos nitrados se lleva a cabo a una longitud de onda de 410 nm utilizando un colorímetro DR/890. Es relevante destacar que el medio de cultivo utilizado contenía una fuente de nitrógeno limitante, en este caso, cloruro de amonio (0.003 g). Esta técnica se emplea con la finalidad de inducir la fijación biológica de nitrógeno en bacterias, especialmente en las bacterias endófitas. La adición de una fuente de nitrógeno fácilmente utilizable, como nitrato ( $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4$ ), a un medio limitado en nitrógeno tiene como objetivo reducir la disponibilidad de nitrógeno, lo que estimula a las bacterias a activar sus sistemas enzimáticos que contienen la nitrogenasa para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Esto permite a las bacterias satisfacer sus requerimientos de nitrógeno en condiciones de escasez, demostrando su capacidad de adaptación y eficiencia en la FBN. Aunque el método de nitrógeno total del Kit de Hach es ampliamente utilizado para cuantificar el nitrógeno, existen otros métodos analíticos como el Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con columna de intercambio iónico y el método de Kjeldahl, que pueden proporcionar información más detallada sobre las diferentes formas de nitrógeno presentes en la muestra, como amonio, nitratos o nitritos. Estos métodos alternativos permiten una caracterización más precisa de la composición del nitrógeno, lo que puede ser relevante para enfocarse en la forma específica de nitrógeno que es utilizada por las plantas para su desarrollo. Sin embargo, en este estudio se optó por utilizar el método de nitrógeno total del Kit de Hach debido a su simplicidad, precisión y que además no se contaba con los materiales para emplear los métodos alternativos.

Como se puede observar en la Tabla 3, que se presenta en la sección de resultados, al inicio de la fermentación, se cuantificó un promedio de  $9.15 \pm 0.5$  mg/L de nitrógeno. Este hallazgo indica que, posterior a la adición del preinóculo al volumen final del inóculo en el reactor, se produjo un proceso de fijación biológica de nitrógeno por parte de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Esta conclusión está respaldada por la medición de la cantidad de biomasa, que fue de  $0.0071 \pm 0.005$  % (m/v), lo que sugiere una conversión de la fuente de carbono, en este caso, el ácido málico y en menor proporción la glucosa, para obtener biomasa y  $\text{N}_2$ . Por otro lado, en la medición promedio después de 168 horas de fermentación, se cuantificó un promedio de  $17.2 \pm 0.5$  mg/L de nitrógeno. Esto indica que Bt tiene la capacidad de aumentar la fijación de nitrógeno atmosférico con el tiempo, bajo condiciones específicas. En la medición final, después de 336 horas de fermentación, se cuantificó un promedio de  $24.3 \pm 0.5$  mg/L de nitrógeno y se observó un aumento significativo en la cantidad de biomasa, que fue de  $0.199 \pm 0.005$  % (m/v), como se evidencia en el balance de masa, tal como se muestra en la Figura 7 de la sección de anexos. En conjunto, estos resultados dieron como resultado un rendimiento de fijación de  $15.147 \text{ mg/L} \pm 0.707$ , equivalente al  $0.001499 \pm 0.005$  % (m/v) de los productos en el balance de masa. La ecuación 4, que se encuentra en los cálculos de muestra de la sección de anexos, nos indica que el rendimiento del producto en relación con la biomasa, denotado como  $Y_{(p/x)}$ , es bastante bajo, con un valor de

0.00625, lo que indica que en la fermentación se está utilizando la biomasa de manera menos eficiente para la producción del producto deseado. Esta baja eficiencia puede tener varias implicaciones, como la necesidad de una mayor cantidad de materias primas, como nutrientes y sustratos, para mantener el crecimiento de la biomasa. Además, puede requerir volúmenes de fermentación más grandes y tiempos de cultivo más prolongados para obtener la cantidad deseada del producto. En resumen, un valor reducido de  $Y_{(p/x)}$  refleja una menor eficiencia en la conversión de biomasa en producto, lo que plantea desafíos en términos de optimización del proceso y uso eficiente de los recursos.

Las investigaciones en el campo de la agricultura han revelado una marcada variabilidad en los requerimientos de nitrógeno en los cultivos. Estas diferencias en las necesidades de nitrógeno en las plantas cultivadas son el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales y fisiológicos. No obstante, se ha estimado que las plantas que establecen simbiosis con bacterias endófitas presentan un requerimiento de nitrógeno en el orden de aproximadamente  $7.5 \text{ g/m}^2$ , lo que equivale a alrededor de  $75 \text{ mg/L}$ , según datos del "*World Fertilizer Use Manual*" (2002). Esta estimación sugiere que la cantidad experimental de nitrógeno atmosférico fijado por *Bacillus thuringiensis*, que asciende a  $15.147 \text{ mg/L} \pm 0.707$ , representa menos del 25% del requerimiento total necesario para un desarrollo óptimo en las plantas. De manera que, para lograr un rendimiento de fijación de nitrógeno más cercano al valor teórico, se hace necesario llevar a cabo ajustes y variaciones en los parámetros experimentales. Comprender estas variaciones es esencial en el contexto de la agricultura y la gestión de cultivos, ya que permite la adaptación precisa de las prácticas de fertilización y agricultura para satisfacer las necesidades específicas de las plantas. Este enfoque adaptativo no solo maximiza la producción de alimentos, sino que también contribuye a la gestión sostenible de los recursos vegetales y a la preservación del medio ambiente.

Por último, tras llevar a cabo el proceso de aislamiento y caracterización de bacterias endófitas, así como la evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y la cuantificación del rendimiento de fijación de nitrógeno, se ha determinado que esta especie exhibe notables propiedades bioinoculantes. Bt, reconocida por su capacidad biocontroladora al producir toxinas Bt para el control de plagas, ha demostrado tener la capacidad de biofijación de nitrógeno atmosférico de manera experimental. Sin embargo, es importante destacar que se requieren evaluaciones adicionales para confirmar plenamente su capacidad como biofijador de nitrógeno. En este sentido, se recomienda llevar a cabo ensayos in vitro utilizando cultivos objetivo e inoculando estos con la bacteria, ya sea en un medio líquido u otra metodología adecuada. Estos experimentos permitirán comprender mejor cómo el endófito aislado influye en la promoción del desarrollo vegetal de los cultivos y proporcionarán datos adicionales sobre su capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones reales. Además, se sugiere la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar y confirmar la presencia de los genes *nifH* característicos de las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno. Esto brindará una evidencia molecular sólida de la capacidad de Bt para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. El desarrollo de esta alternativa ecológicamente viable tiene el potencial de reducir la

dependencia de compuestos inorgánicos en la agricultura, lo que podría contribuir significativamente al mejoramiento de las prácticas agrícolas en el país y aportar valor a la sostenibilidad de las actividades agrícolas.

## IX. CONCLUSIONES

1. Por medio del proceso de esterilización superficial de los tejidos vegetales se logró llevar a cabo el aislamiento de bacterias endófitas provenientes de explantes de raíz, tallos y hojas de plantas de jitomate, se logró determinar que en las muestras utilizadas se obtuvo un mayor número de aislados en los tallos y hojas, 6 colonias cada una respectivamente.
2. Se logró determinar que, de las 9 colonias seleccionadas como potenciales fijadores de nitrógeno, únicamente 4 colonias gram positivas exhibieron una actividad fijadora de nitrógeno positiva, de las cuales una colonia provenía de la raíz, 2 de ellas provenientes de las hojas y 1 colonia provenía de los tallos.
3. Por medio de la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal, se logró identificar 2 de las 4 cepas bajo análisis, a partir de los datos resultantes de la secuenciación, se logró identificar cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, específicamente la especie *Bacillus thuringiensis*, para las muestras N3 y N4.
4. Por medio del Kit de Hach se logró cuantificar la cantidad de nitrógeno atmosférico fijador por *Bacillus thuringiensis* en el fermentador de 1 litro tras 2 semanas de fermentación y se obtuvo un rendimiento de fijación de  $15.147 \text{ mg/L} \pm 0.707$  respectivamente.

## X. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda llevar a cabo ensayos in vitro utilizando cultivos objetivo e inoculando estos con la bacteria, ya sea en un medio líquido u otra metodología adecuada. Estos experimentos permitirán comprender mejor cómo el endófito aislado influye en la promoción del desarrollo vegetal de los cultivos y proporcionarán datos adicionales sobre su capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones reales.
2. Se recomienda la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar y confirmar la presencia de los genes *nifH* característicos de las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno. Esto brindará una evidencia molecular sólida de la capacidad de *Bacillus thuringiensis* para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno.
3. Se recomienda evaluar el uso de técnicas de ingeniería genética como CRISPR-Cas9, para la edición de genes de interés como los genes *nifH* de la fijación biológica de nitrógeno, de esta forma poder inducir genes especializados a bacterias que posean propiedades bioinoculantes como *Bacillus thuringiensis*.
4. Se recomienda llevar a cabo un modelo cinético del proceso para así poder comprender, predecir y optimizar el proceso de fermentación de la bacteria y documentar como es que actúa la enzima nitrogenasa y su interacción con el sustrato.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Alori ET, Dare MO, Babalola OO. (2017). *Microbial inoculants for soil quality and plant health*. Sust Agric Rev., 281-307.
2. Ariaza, S., González, O., & López, J. (2020). *Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en el suelo degradado*. Universidad de Medellín, Colombia. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.78019.
3. Bashan Y, De-Bashan LE, Prabhu SR, Hernández JP. (2014). *Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013)*. Plant Soil., 378: 1-33.
4. Beck, D., Materon, L., Afandi, F. (1993). *Practical rhizobium-legume technology manual*. ICARDA, Syria. p. 55.
5. Berendsen, R. L. et al. (2018). *Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium*. ISME J., 12, 1496–1507.
6. Borriss, R. (2013). *Use of Plant-Associated Bacillus Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture*. En D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 40-82). Springer Berlin Heidelberg.
7. Castro, S., & Roa, C. (2006). *Bacterias endófitas de Cordia alliodora Oken y Tabebuia rosea Bertold D.C. potencial como promotoras de crecimiento vegetal en la propagación de su hospedero*. Microbiología agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
8. Chemicals and Biological Technologies in Agriculture. (2014). 1(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0012-2>
9. Contreras RA, Gómez BA, Veloz RA. (2017). *Efecto de las bacterias de suelo de bosque benéficas para plantas*. Jóvenes en la ciencia. 3(2): 943-947.
10. Cregger, M. A. et al. (2018). *The Populus holobiont: dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome*. Microbiome, 6, 31.

11. De Souza, R. S. C. et al. (2016). *Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome*. *Sci. Rep.*, 6, 28774.
12. Edwards, J. A. et al. (2018). *Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice*. *PLoS Biol.*, 16, e2003862.
13. Gibbs, H. K., & Salmon, J. M. (2015). *Mapping the world's degraded lands*. *Applied Geography*, 57, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2014.11.024>.
14. Gloria, T. C. et al. (2018). *Functional microbial features driving community assembly during seed germination and emergence*. *Front. Plant Sci.*, 9, 902.
15. Haider, K., & Schäffer, A. (2009). *Soil biochemistry*. Science Publishers.
16. Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., & Borriss, R. (2015). *Extracellular phytase activity of Bacillus amyloliquefaciens FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect*. *J Basic Microbiol.*, 13.
17. IFA. (2002). *World fertilizer use manual*. Paris, France. <https://www.fao.org/3/x4781s/x4781s.pdf>
18. Ivo, J., Massena, V., Sampaio, S., Boddey, L., & Divan, V. (2014). *The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists*. Methods paper, Springer. DOI: 10.1007/s11104-014-2186-6.
19. Kwak, M. J. et al. (2018). *Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato*. *Nat. Biotechnol.*, 36, 1100–1109.
20. Levitus, G., Echenique, V., Hopp, E., & Mronginski, L. (2020). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Extraído de: <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalI.pdf>
21. López Pérez, J. P., & Boronat Gil, R. (2016). *Aspectos básicos de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias*. Estudio en el laboratorio de educación secundaria.

Revista eureka sobre enseñanza y divulgación de las ciencias, 13(1), 203-209.  
[https://doi.org/10.25267/Rev\\_Eureka\\_ensen\\_divulg\\_cienc.2016.v13.i1.15](https://doi.org/10.25267/Rev_Eureka_ensen_divulg_cienc.2016.v13.i1.15).

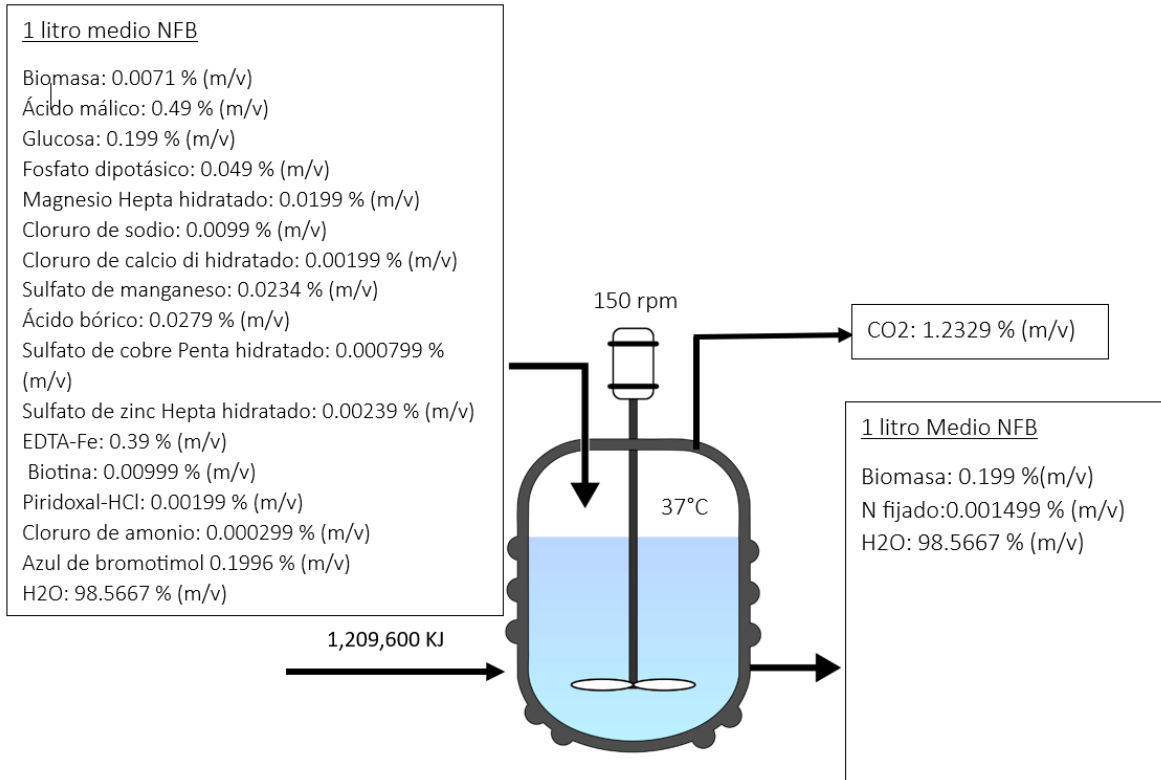
22. Longoria, R., Félix, R., & Cordero, J. (2020). *Diversidad de bacterias endófitas asociadas a plantas de jitomate (Solanum lycopersicum)*. Universidad Autónoma de Occidente. Departamento de Ciencias Biológicas. Los Mochis, Sinaloa, México. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2002-7>.
23. Mau, S., Vega, K., & Sánchez, M. (2011). *Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales*. Universidad Nacional, Costa Rica. DOI: <http://dx.doi.org/10.15359/rca.42-2.4>.
24. Menéndez E, García-Fraile P. (2017). *Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world*. AIMS Microbiol. 3(3): 502-524.
25. Ortiz, M., Hernández, J., Valenzuela, B., Villalobos, S., Granados, M., & Santoyo, G. (2018). *Diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (Vaccinium corymbosum L.) cv. Biloxi con actividades promotoras del crecimiento vegetal*. Laboratorio de diversidad genómica, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. ISSN: 0719-3890.
26. Pérez, A., Tuberquia, A., & Amell, D. (2014). *Actividad in vitro de bacterias endofitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos*. Universidad de Sucre, Colombia. Extraído de: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212014000200001](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212014000200001).
27. Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). *Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture*. Current Opinion in Biotechnology, 22(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>.
28. Porto de Souza L, Blandon LM, Rodrigues C, Cândido M, Vinicius de Melo G, De Oliveira J et al. (2017). *Potential applications of plant probiotic microorganisms in agricultura and forestry*. AIMS Microbiol., 3(3): 629-648.
29. Puente M, García J, Rubio E, Peticari A. (2011). *Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo*. Miscelánea, 116: 89-92.

30. Qiao, J.-Q., Wu, H.-J., Huo, R., Gao, X.-W., & Borriss, R. (2014). *Stimulation of plant growth and biocontrol by Bacillus amyloliquefaciens subsp. Plantarum FZB42 engineered for improved action.*
31. Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). *Soil microorganisms mediating phosphorus availability.* Plant Physiology, 156(3), 989-996.
32. Rojas Tapias D, Gil Montoya L, Rivera D, Obando M, Bonilla R. (2014). *Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on growth of maize seedlings under greenhouse conditions.* Sinapub, 2(1): 57-70.
33. Ruíz E, Rincón D. (2019). *Diversidad microbiana en el suelo.* Universidad de San Carlos, Guatemala.
34. Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2016). *Plant growth-promoting bacterial endophytes.* Microbiological Research, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.
35. Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3rd ed.).* American Phytopathological Society Press.
36. Schlaeppli K, Bulgarelli D. (2015). *The plant microbiome at work.* Molecular Plant Microbe Interactions, 28(3), 212-217.
37. Silva GM, Maia LC, Oehl F. (2015). *Fungos micorrízicos arbusculares em áreas de cultivo de cebola e preservação de caatinga no semiárido do Pernambuco, Brasil.* Rev Bras Cienc Solo., 39(3): 792-803.
38. Silva JF, Garcia FJ, Silva EA, Oliveira RR, Ferreira JAC, Lima LHE. (2016). *Controle biológico de doenças de plantas por rizobactérias no Brasil.* Biol Agric Hortic. 33(1): 57-70.
39. Sinclair WA, Lyon HH. (2005). *Diseases of trees and shrubs.* 2nd Ed. Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY.
40. Sivapalan A. (2014). *Benefits of biofertilizers to sugarcane and mechanisms of N<sub>2</sub> fixation by endophytic diazotrophs.* Australian Society of Sugar Cane Technologists, 31: 142-151.

41. Swain MR, Naskar SK, Ray RC. (2007). *Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (Dioscorea rotundata L.) minisetts by Bacillus subtilis isolated from culturable cowdung microflora*. Pol J Microbiol. 56: 103-110.
42. Valenzuela-Estrada, L. R., Vera-Caraballo, V., Gillespie, A., & Vargas-Madriz, H. (2008). *Developing drought and salt tolerance in plants using plant growth promoting bacteria: Current research and future challenges*. Functional Plant Biology, 35(7), 677-683. <https://doi.org/10.1071/FP08043>.
43. Veobides, H., Guridi, F., & Padrón, V. (2019). *Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental*. Instituto nacional de ciencias agrícolas. Extraído de: <http://www.scielo.sld.cu/pdf/ctr/v39n4/ctr15418.pdf>
44. Vera-Caraballo, V. et al. (2020). *Plant growth-promoting rhizobacteria: Solutions for crop productivity challenges in a changing climate*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 36(4), 50. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02854-7>.
45. Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). *Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress*. Trends in Plant Science, 14(1), 1-4.
46. Yousuf, J., Thajudeen, J., Rahiman, M., Krishnankutty, S., P. Alikunj A., & Abdulla, M. H. (2017). *Nitrogen fixing potential of various heterotrophic Bacillus strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions*. J Basic Microbiol. (11): 922-932. doi: 10.1002/jobm.201700072. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28787089.

## XII. ANEXOS

Figura 7. Diagrama representativo del balance de masa y energía para un lote en biorreactor



### A. DATOS ORIGINALES

Tabla 4. Determinación de la biomasa final por peso seco

No. de tubo	Peso tubo con biomasa seca (± 0.001 g)	Peso del tubo vacío (± 0.001 g)	Biomasa obtenida g/mL
<b>1</b>	5.987	5.985	0.002
<b>2</b>	5.897	5.895	0.002
<b>3</b>	5.960	5.958	0.002

Tabla 5. Componentes de medio libre de nitrógeno NFB

<b>Componente</b>	<b>Peso g/L (± 0.001 g)</b>	<b>%(m/v) (±0.005%)</b>
Ácido málico	5.00	0.49
Glucosa	2.00	0.199
Fosfato dipotásico	0.5	0.049
Magnesio hepta hidratado	0.2	0.0199
Cloruro de sodio	0.1	0.0099
Cloruro de amonio	0.003	0.000299
Cloruro de calcio di hidratado	0.02	0.00199
Ácido bórico	0.28	0.0279
Sulfato de maganeso	0.235	0.0234
Sulfato de cobre Penta hidratado	0.008	0.000799
Sulfato de zinc hepta hidratado	0.024	0.00239
Ácido etilendiaminotetraacético -Fe	4	0.3984
Biotina	0.1	0.00999
Piridoxal-HCl	0.2	0.00199
Azul de bromotimol	2	0.1996

Figura 8. Representación gráfica de número de colonias totales aisladas por muestra y explante

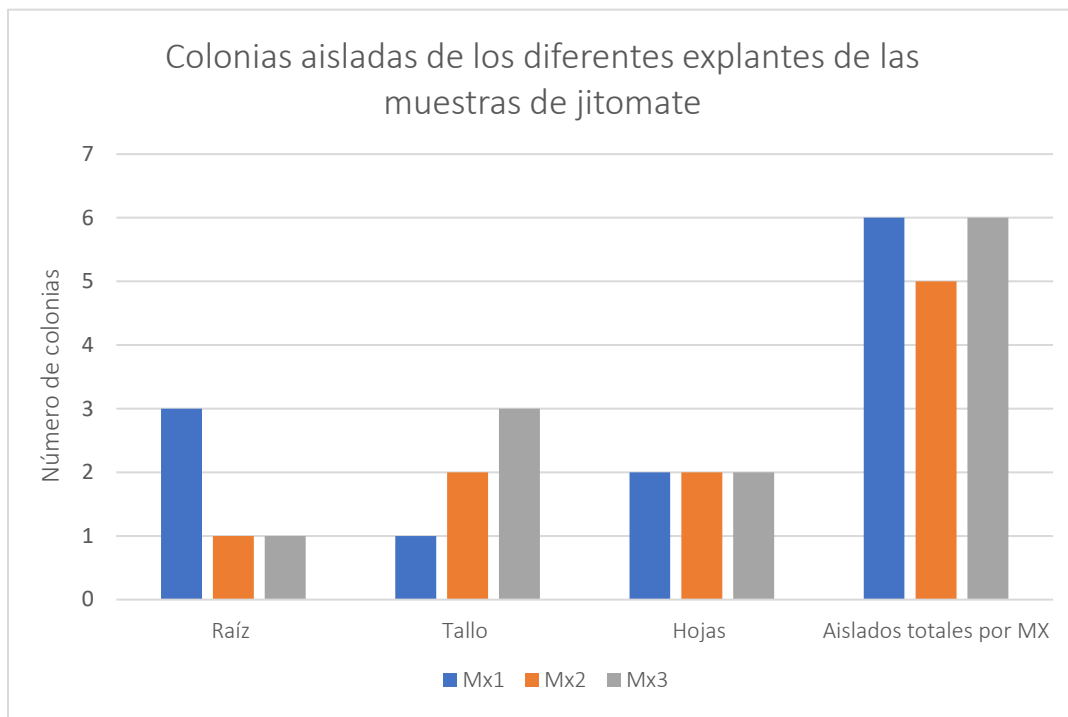
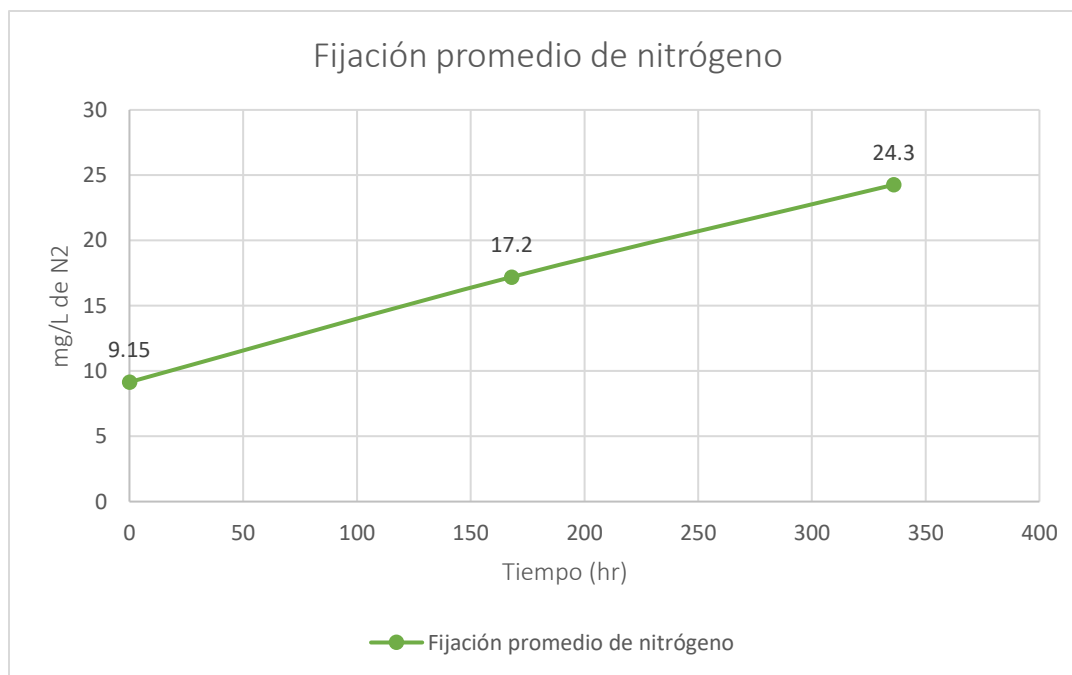


Figura 9. Cuantificación promedio de nitrógeno a lo largo del tiempo



## B. DATOS CALCULADOS

1. % (m/v) Ácido málico

$$\% \frac{m}{V} = \frac{Masa \text{ soluto}}{Masa \text{ solución}}$$

$$Masa \text{ soluto} = 5 \text{ g}$$

$$Volumen \text{ solvente} = 1000 \text{ ml}$$

$$Volumen \text{ solución} = 1005 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{5 \text{ g}}{1005 \text{ ml}} * 100 = 0.49 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

2. % (m/v) Glucosa

$$Masa \text{ soluto} = 2 \text{ g}$$

$$Volumen \text{ solvente} = 1000 \text{ ml}$$

$$Volumen \text{ solución} = 1002 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{2 \text{ g}}{1002 \text{ ml}} * 100 = 0.199 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

3. % (m/v) Fosfato dipotásico

$$Masa \text{ soluto} = 0.5 \text{ g}$$

$$Volumen \text{ solvente} = 1000 \text{ ml}$$

$$Volumen \text{ solución} = 1000.5 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.5 \text{ g}}{1000.5 \text{ ml}} * 100 = 0.049 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

4. % (m/v) Magnesio hepta hidratado

$$Masa \text{ soluto} = 0.2 \text{ g}$$

$$Volumen \text{ solvente} = 1000 \text{ ml}$$

$$Volumen \text{ solución} = 1000.2 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.2 \text{ g}}{1000.2 \text{ ml}} * 100 = 0.0199 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

5. % (m/v) Cloruro de sodio

$$Masa_{soluta} = 0.1 g$$

$$Volumen_{solvente} = 1000 ml$$

$$Volumen_{solución} = 1000.1 ml$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.1 g}{1000.1 ml} * 100 = 0.0099 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

6. % (m/v) Cloruro de calcio di hidratado

$$Masa_{soluta} = 0.02 g$$

$$Volumen_{solvente} = 1000 ml$$

$$Volumen_{solución} = 1000.02 ml$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.02 g}{1000.02 ml} * 100 = 0.00199 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

7. % (m/v) Sulfato de manganeso

$$Masa_{soluta} = 0.235 g$$

$$Volumen_{solvente} = 1000 ml$$

$$Volumen_{solución} = 1000.235 ml$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.235 g}{1000.235 ml} * 100 = 0.0234 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

8. % (m/v) Ácido bórico

$$Masa_{soluta} = 0.28 g$$

$$Volumen_{solvente} = 1000 ml$$

$$Volumen_{solución} = 1000.28 ml$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.28 g}{1000.28 ml} * 100 = 0.0279 \% \left( \frac{m}{v} \right)$$

9. % (m/v) Sulfato de cobre penta hidratado

$$Masa_{soluta} = 0.008g$$

$$Volumen_{solvente} = 1000ml$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1000.008 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.008 \text{ g}}{1000.008 \text{ ml}} * 100 = 0.000799\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

10. % (m/v) Sulfato de zinc hepta hidratado

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 0.024 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1000.024 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.024 \text{ g}}{1000.024 \text{ ml}} * 100 = 0.00239\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

11. % (m/v) EDTA-Fe

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 0.0656 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1000.0656 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.0656 \text{ g}}{1000.0656 \text{ ml}} * 100 = 0.00655\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

12. % (m/v) Biotina

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 0.1 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1000.1 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.1 \text{ g}}{1000.1 \text{ ml}} * 100 = 0.00999\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

13. % (m/v) Piridoxal-HCl

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 0.02 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1000.02 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.02 \text{ g}}{1000.02 \text{ ml}} * 100 = 0.00199\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

14. % (m/v) Cloruro de amonio

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 0.003 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1000.03 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.003 \text{ g}}{1000.03 \text{ ml}} * 100 = 0.000299\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

15. % (m/v) Azul de bromotimol

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 2.00 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1002.00 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{2 \text{ g}}{1002.00 \text{ ml}} * 100 = 0.1996\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

16. % (m/v) Biomasa inicial

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 0.071 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1000.071 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{0.071 \text{ g}}{1000.071 \text{ ml}} * 100 = 0.0071\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

17. % (m/v) Biomasa final

$$\text{Masa}_{\text{sóluto}} = 2.00 \text{ g}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solvente}} = 1000 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen}_{\text{solución}} = 1001.00 \text{ ml}$$

$$\% \frac{m}{V} = \frac{2.00 \text{ g}}{1002.00 \text{ ml}} * 100 = 0.199\% \left( \frac{m}{v} \right)$$

18. %(m/v) Nitrógeno fijado

$$\begin{aligned} \text{Masa}_{\text{solute}} &= 0.015g \\ \text{Volumen}_{\text{solvente}} &= 1000ml \\ \text{Volumen}_{\text{solución}} &= 1000.015 ml \\ \% \frac{m}{V} &= \frac{0.015g}{1000.015ml} * 100 = 0.001499\% \left( \frac{m}{v} \right) \end{aligned}$$

**C. CALCULOS DE MUESTRA**

**Cálculo 1. Incertidumbre del promedio**

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecu.1})$$

Empleando los datos experimentales de la Tabla 3. de la sección de resultados

$$6.7 + 9.1 + 11.6 = 27.4$$

$$(0.5)^2 + (0.5)^2 + (0.5)^2 = 0.25 + 0.25 + 0.25 = 0.75$$

$$\text{incertidumbre de la suma} = \sqrt{0.75} \approx 0.866$$

$$\text{promedio} = \frac{27.4}{3} \approx 9.133$$

$$\frac{\text{incertidumbre de la suma}}{\sqrt{n}} = \frac{0.866}{\sqrt{3}} \approx 0.5$$

**Cálculo 2. Incertidumbre de la resta**

$$\delta R = \sqrt{(\delta A)^2 + (\delta B)^2} \quad (\text{Ecu.2})$$

Empleando los datos experimentales de la Tabla 3. de la sección de resultados

$$24.3 - 9.15 = 15.15$$

$$(0.5)^2 + (0.5)^2 = 0.25 + 0.25 = 0.5$$

$$\text{incertidumbre de la resta} = \sqrt{0.5} \approx 0.707$$

### Cálculo 3. Incertidumbre de una división

$$\delta R = \sqrt{\left(\frac{\delta A}{B}\right)^2 + \left(\frac{A \cdot \delta b}{B^2}\right)^2} \quad (\text{Ecu.3})$$

Empleando los datos experimentales de la Tabla 5.

$$\frac{2}{1002} \times 100 = 0.1996\%$$

$$\delta R = \sqrt{\left(\frac{0.001}{0.1996}\right)^2 + \left(\frac{0 \cdot 0.001}{0.1996^2}\right)^2}$$

$$\delta R = \sqrt{\left(\frac{0.001}{0.1996}\right)^2 + 0}$$

$$\delta R = \frac{0.001}{0.1996} = 0.005\%$$

### Cálculo 4. Rendimiento del producto en relación con la biomasa

$$Y_{\frac{p}{x}} = \frac{dp}{dx} \quad (\text{Ecu.4})$$

Empleando los datos del balance de masa Figura 7.

$$Y_{\frac{p}{x}} = \frac{(0.001499 - 0.000299)\% \left(\frac{m}{v}\right)}{(0.199 - 0.0071)\% \left(\frac{m}{v}\right)} = 0.00625$$

### Cálculo 5. Balance de energía

$$\begin{aligned} 1000 \text{ W} \times \frac{0.001 \text{ kW}}{1 \text{ W}} \times \frac{1 \text{ kW}}{1 \text{ h}} &= 1 \frac{\text{kW}}{\text{h}} \times \frac{24 \text{ h}}{1 \text{ día}} \times 14 \text{ día} = 336 \text{ kW} \times \frac{3600 \text{ kJ}}{1 \text{ kW}} \\ &= 1,209,600.00 \text{ kJ} \end{aligned}$$

### Cálculo 6. Conversión de requerimiento de nitrógeno en plantas

$$7.5 \frac{\text{g}}{\text{m}^2} \times \frac{1 \text{ m}^2}{0.10 \text{ m}^3} \times \frac{0.001 \text{ m}^3}{1 \text{ L}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 75 \text{ mg/L}$$

## D. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA

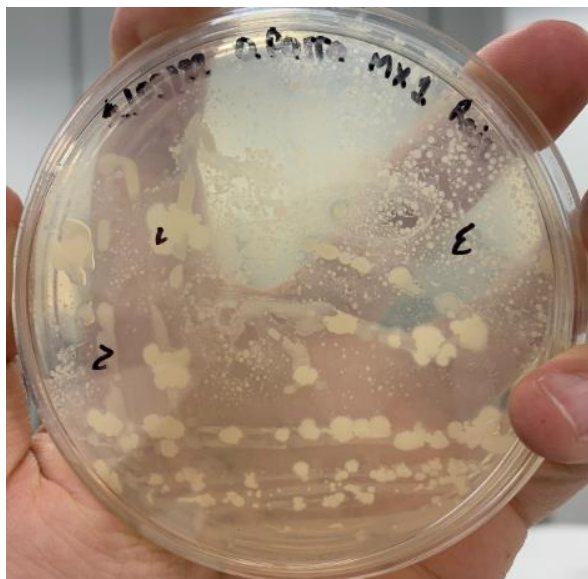
Figura 10. Procesamiento de las muestras de tejido vegetal y primer aislamiento de bacterias



**Fig. 7** Paso I, selección de tejido vegetal a utilizar en triplicado. Paso II, obtención de explantes de raíz, tallo y hojas de las tres muestras de tejido vegetal. Paso III y IV, proceso de esterilización de los explantes obtenidos el cual consistió en dos lavados de cada explante en agua destilada esterilizada, seguida de agitación por 15 min en solución tampón de fosfato de potasio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; inmersión por 1 min en alcohol 70%; agitación por 5 min en solución de hipoclorito de sodio 5%; nuevamente inmersión por 1 min en alcohol 70% seguida de agitación por 15 min en solución tampón fosfato de potasio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 y finalmente, lavado cuatro veces en agua destilada esterilizada. Paso V, sembrado de los explantes en 50 ml de caldo nutritivo en Erlenmeyers previamente esterilizados. Paso VI, incubación de los explantes previamente sembrados en caldo nutritivo en incubadora a 37°C durante 48 horas. Paso VII, con asa bacteriológica se tomó un asado de los explantes previamente incubados en caldo nutritivo y se sembraron en placas de agar nutritivo haciendo uso de técnica de estriado en placa para obtención de colonias.

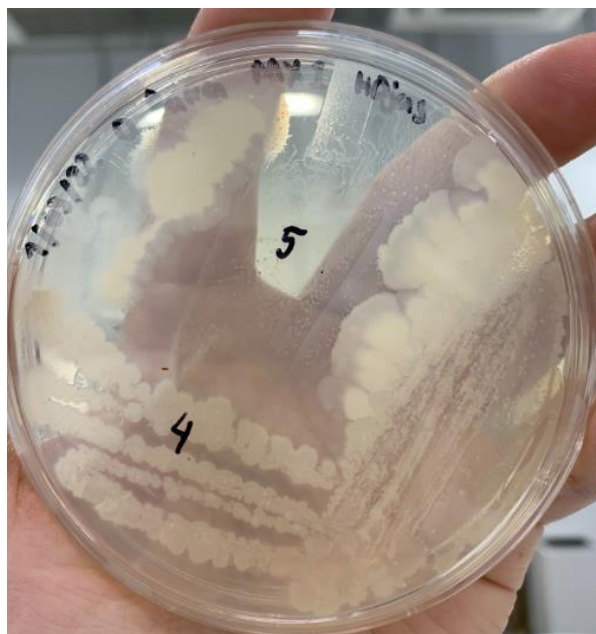
## A. SEGUNDO AISLAMIENTO DE COLONIAS BACTERIANAS

Figura 11. Obtención de colonias bacterianas: Mx1, raíz.



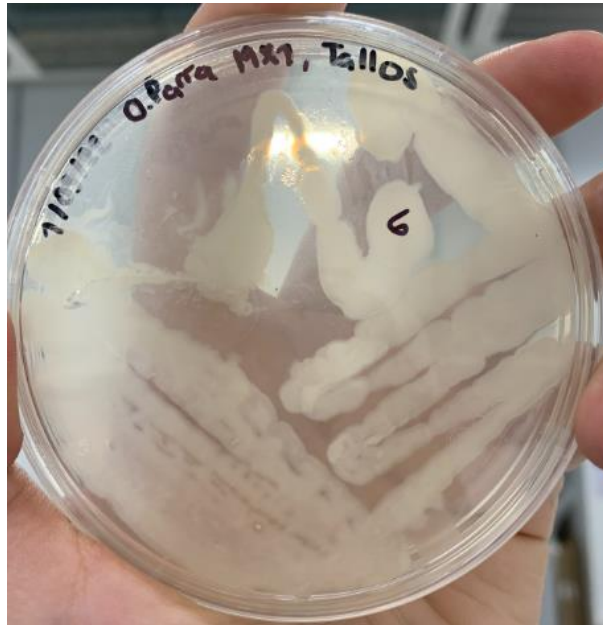
*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx1 de la raíz. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cuales se identificaron con los números 1,2 y 3.*

Figura 12. Obtención de colonias bacterianas: Mx1, Hoja.



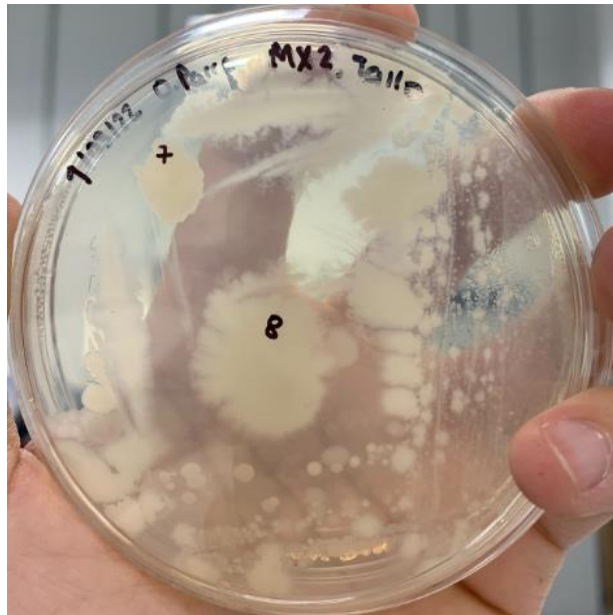
*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx1 de las hojas. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cuales se identificaron con los números 4 y 5.*

Figura 13. Obtención de colonias bacterianas: Mx1, tallo.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx1 del tallo. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cual se identificó con el número 6.*

Figura 14. Obtención de colonias bacterianas: Mx2, Tallo.



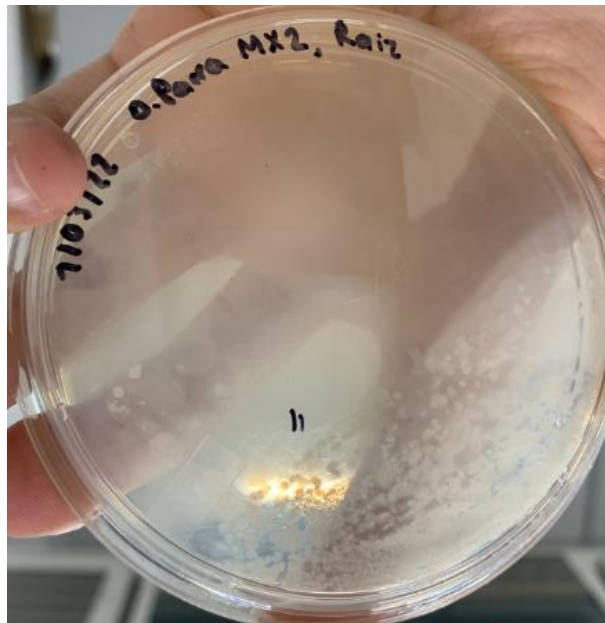
*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx2 del tallo. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cuales se identificaron con los números 7 y 8.*

Figura 15. Obtención de colonias bacterianas: Mx2, Hoja.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx2 de las hojas. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cuales se identificaron con los números 9 y 10.*

Figura 16. Obtención de colonias bacterianas: Mx2, Raíz.



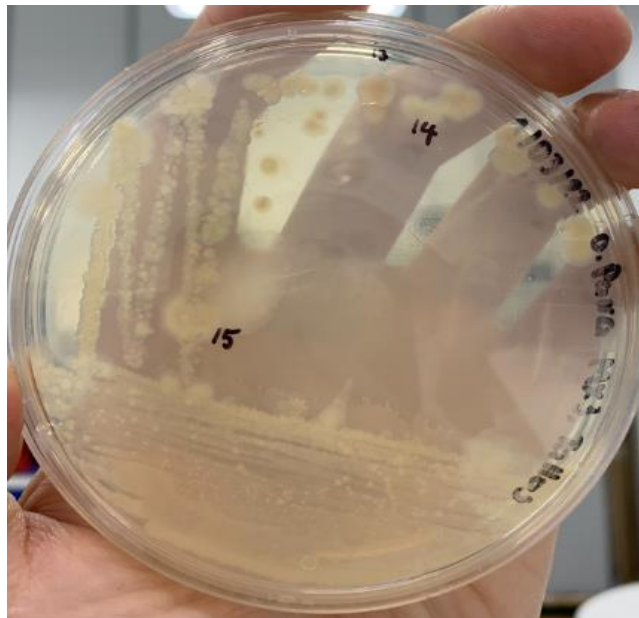
*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx2 de la raíz. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cual se identificó con el número 11.*

Figura 17. Obtención de colonias bacterianas: Mx3, Hoja.



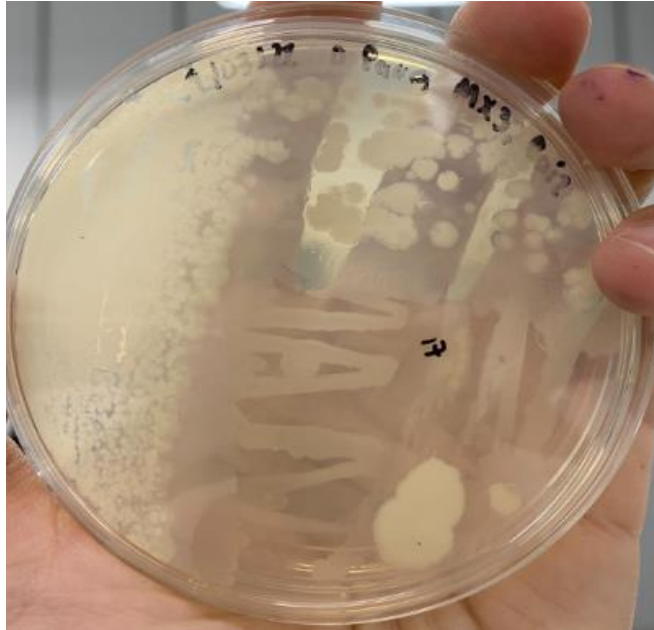
*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx3 de las hojas. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cuales se identificaron con los números 12 y 16.*

Figura 18. Obtención de colonias bacterianas: Mx3, Tallo.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx3 del tallo. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas las cuales se identificaron con los números 13, 14 y 15.*

Figura 19. Obtención de colonias bacterianas: Mx3, Raíz.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del primer aislamiento de la Mx3 del tallo. A partir del primer aislamiento realizado en caldo nutritivo, se tomó un asada y se inoculo en placa de agar nutritivo y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidenció el crecimiento de 3 diferentes tipos de colonias bacterianas la cual se identificó con el número 17.*

## B. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y TINCIÓN DE GRAM

Tabla 6. Descripción morfológica colonial obtenida mediante estriado en placa.

Aislado	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Aspecto	Color	Tamaño	Gram
<b>MX1 raíz</b>									
<b>1</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Crema	Mediano	+
<b>2</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Beige	pequeño	-
<b>3</b>	Circular	Entero	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Crema	Pequeño	-
<b>MX1 Hojas</b>									
<b>4</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Sin brillo	Crema opaca	mediano	+
<b>5</b>	Circular	Entero	Plana	Lisa	Mucoide	Sin brillo	Crema opaca	pequeño	-
<b>MX1 Tallos</b>									
<b>6</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Crema	Mediano	+
<b>MX2 Tallo</b>									
<b>7</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Sin brillo	Crema	Mediano	+
<b>8</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Sin brillo	Crema opaca	Grande	+
<b>MX2 Hoja</b>									
<b>9</b>	Circular	Entero	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Beige	pequeño	-
<b>10</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Sin brillo	Crema opaca	Mediano	+
<b>MX2 Raíz</b>									
<b>11</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Crema	pequeño	-
<b>MX3 Hojas</b>									
<b>12</b>	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa	Mucoide	Sin Brillo	Crema opaca	Mediana	+
<b>16</b>	Circular	Entero	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Blanco	Pequeño	-
<b>MX3 Tallo</b>									
<b>13</b>	Circular	Entero	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Rosa	Pequeño	-
<b>14</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Brillante	Amarillento	Pequeño	-
<b>15</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Mucoide	Sin brillo	Crema opaca	Pequeño	-
<b>MX3 Raíz</b>									
<b>17</b>	Circular	Entero	Plana	Lisa	Mucoide	Sin brillo	Crema opaca	Pequeño	-

### C. OBTENCIÓN DE COLONIAS PURAS

Figura 20. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx1, Raíz.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx1 de la raíz. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 1 del primer aislamiento.*

Figura 21. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx1, Hoja.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx1 de la hoja. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 4 del primer aislamiento.*

Figura 22. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx1, Tallo.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx1 del tallo. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 6 del primer aislamiento.*

Figura 23. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Tallo.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx2 del tallo. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 7 del primer aislamiento.*

Figura 24. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Tallo.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx2 del tallo. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 8 del primer aislamiento.*

Figura 25. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Hoja.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx2 de la hoja. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 10 del primer aislamiento.*

Figura 26. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx2, Raíz.



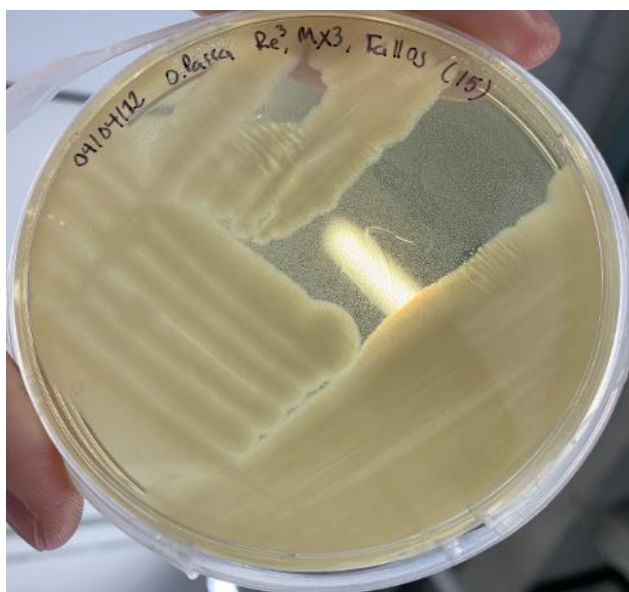
*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx2 de la raíz. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 11 del primer aislamiento.*

Figura 27. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx3, Hoja.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx3 de la hoja. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 12 del primer aislamiento.*

Figura 28. Obtención de colonias bacterianas puras: Mx3, Tallo.



*Se muestran las colonias aisladas a partir del reaislamiento de la Mx3 del tallo. A partir del segundo aislamiento en agar nutritivo, se tomó un asada y se utilizó el método de estriado en placa para la obtención de cultivos puros; se dejó incubando a 37°C durante 72 horas. Se evidencio el crecimiento de colonias bacterianas puras, es decir el mismo tipo de bacteria perteneciente a la colonia 15 del primer aislamiento.*

## D. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO EN MEDIO NFB

- a. Figura 29. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX1, Raíz.



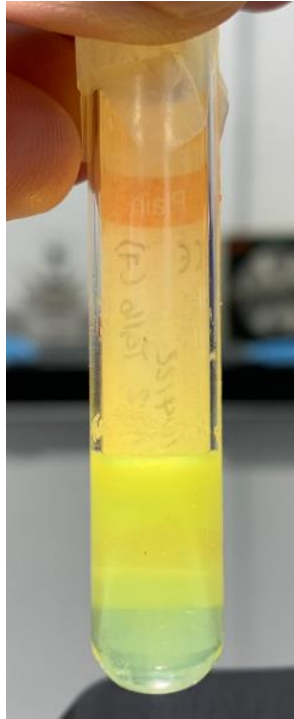
*Se muestran los resultados para la fijación de nitrógeno atmosférico de colonia bacteriana aislada de MX1 de la raíz. Con ayuda de un asa bacteriológica se inoculo el medio semisólido NFB (libre de nitrógeno) con colonia bacteriana aislada y se dejó incubando a 37°C durante 1 semana. Se evidencia turbidez y partículas suspendidas, lo que indica que la bacteria inoculada fue capaz de fijar nitrógeno atmosférico.*

Figura 30. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX1, Hoja.



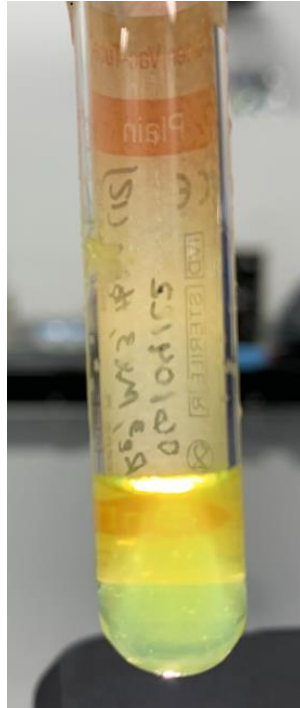
*Se muestran los resultados para la fijación de nitrógeno atmosférico de colonia bacteriana aislada de MX1 de la hoja. Con ayuda de un asa bacteriológica se inoculo el medio semisólido NFB (libre de nitrógeno) con colonia bacteriana aislada y se dejó incubando a 37°C durante 1 semana. Se evidencia turbidez y partículas suspendidas, lo que indica que la bacteria inoculada fue capaz de fijar nitrógeno atmosférico.*

Figura 31. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX2, Tallo.



*Se muestran los resultados para la fijación de nitrógeno atmosférico de colonia bacteriana aislada de MX2 del tallo. Con ayuda de un asa bacteriológica se inoculo el medio semisólido NFB (libre de nitrógeno) con colonia bacteriana aislada y se dejó incubando a 37°C durante 1 semana. Se evidencia turbidez y partículas suspendidas, lo que indica que la bacteria inoculada fue capaz de fijar nitrógeno atmosférico.*

Figura 32. Actividad fijadora de nitrógeno de bacteria aislada: MX3, Hoja.



*Se muestran los resultados para la fijación de nitrógeno atmosférico de colonia bacteriana aislada de MX3 de la hoja. Con ayuda de un asa bacteriológica se inoculo el medio semisólido NFB (libre de nitrógeno) con colonia bacteriana aislada y se dejó incubando a 37°C durante 1 semana. Se evidencia turbidez y partículas suspendidas, lo que indica que la bacteria inoculada fue capaz de fijar nitrógeno atmosférico.*

## E. REPORTE DE SERVICIO DE SECUENCIACIÓN

Figura 33. Resultados de la secuenciación 16S rRNA de colonia N3.

# Standard ID



## 16S rRNA service report

Order Number : HC00474890  
Sample name : N3\_contig\_1

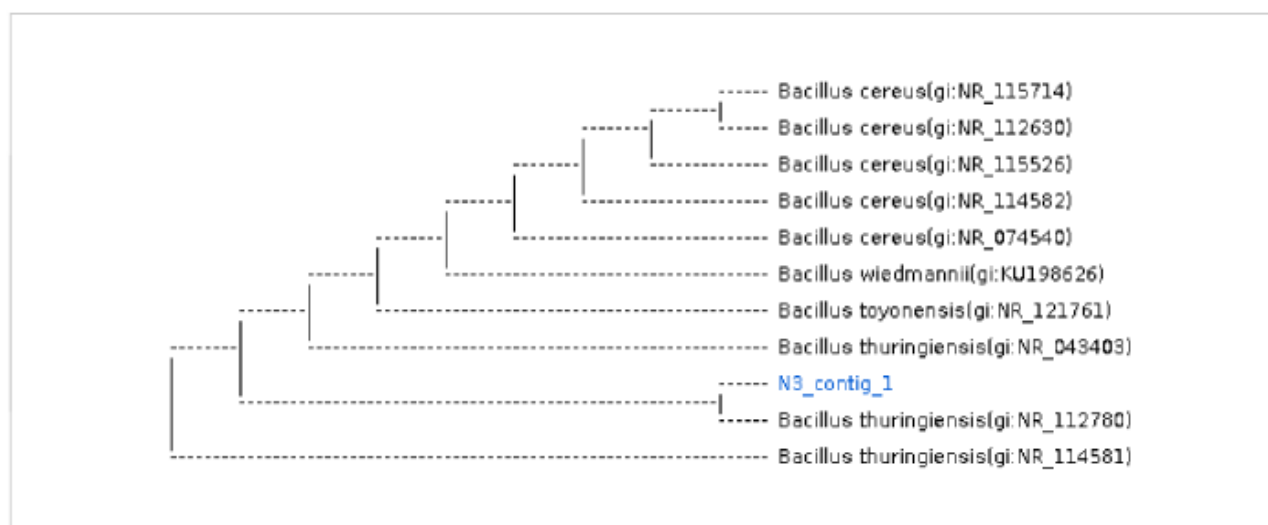
### Information

#### Primer Information

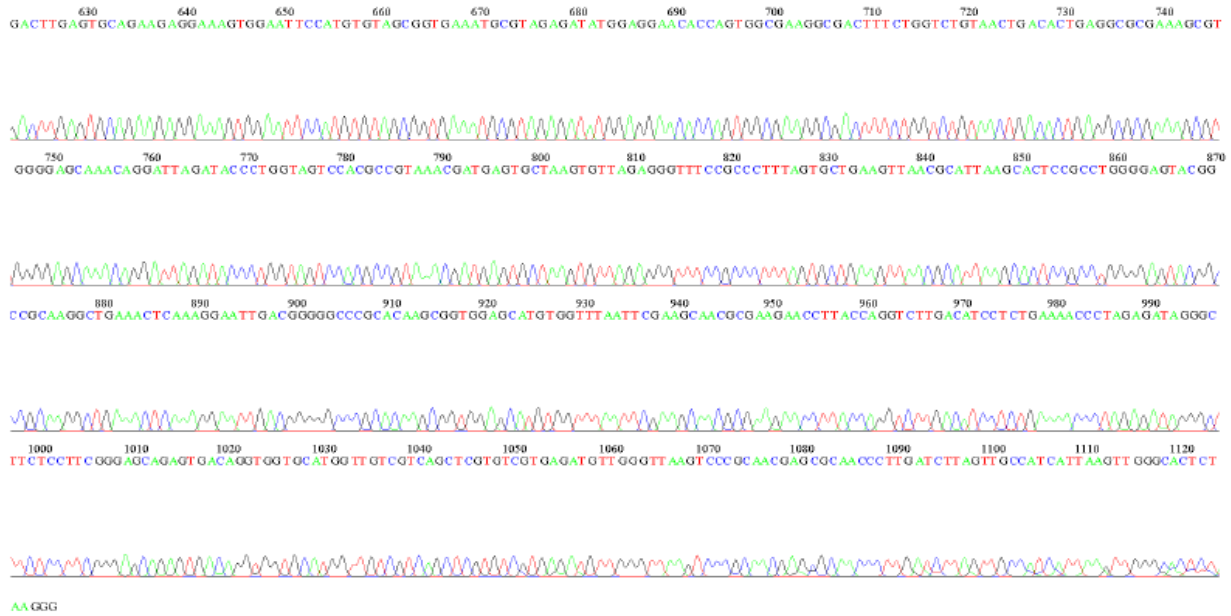
Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
CP021061.1	Bacillus thuringiensis	542759 4	53500 98	53515 89	0	2743	0.0	1490/1492	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus thuringiensis







Se muestran los resultados para el espectro de ADN de la bacteria secuenciada (muestra N3). Se logra evidenciar una secuencia limpia, en la cual se tienen picos bien definidos (erguidos y separados) los cuales no se muestran traslapados. Por otro lado, la línea base de los picos se encuentra completamente plana por lo que dichos aspectos se pueden correlacionar a una correcta asignación de nucleótidos para la secuencia analizada. Por lo contrario, si no se contara con una secuencia limpia se mostrarían picos traslapados, una línea base no plana y nucleótidos con la letra N lo que indicaría que no se le puede asignar un nucleótido debido a alguna contaminación o una mezcla de secuencias.

Figura 35. Resultados de la secuenciación 16S rRNA de colonia N4.

# Standard ID



## 16S rRNA service report

Order Number : HC00474890  
 Sample name : N4\_contig\_1

### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
CP021061.1	Bacillus thuringiensis	542759 4	88814	90298	0	2736	0.0	1484/1485	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus thuringiensis

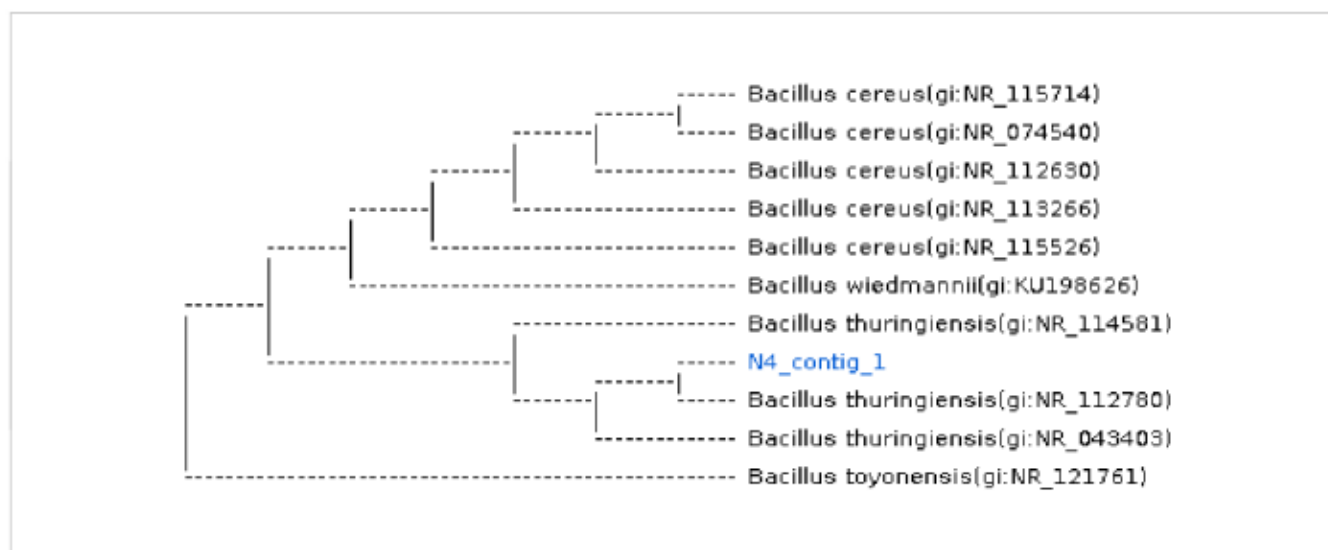


Figura 36. Espectro de ADN para la muestra N4



File: N4\_27F.ab1 Run Ended: 2022/5/11 4:23:3 Signal G:3417 A:4834 C:6073 T:5030  
Sample: N4\_27F Lane: 4 Base spacing: 16.991066 1123 bases in 13422 scans Page 2 of 2

TGCAGAAAGAGGAAAAGTGGAAATCCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC

AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGAAATTAAAGCACTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG

GCTGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCAAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAAGCAACCGGAAAGAAACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTTAGAGATAAGGCCTTCTCC

TTCCGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTCCGTGCTTGAAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAGCCCTTGATCTTAGITGCCATCAITTAATTTGGGCCCC

TTCCGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTCCGTGCTTGAAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAGCCCTTGATCTTAGITGCCATCAITTAATTTGGGCCCC

Se muestran los resultados para el espectro de ADN de la bacteria secuenciada (muestra N4). Se logra evidenciar una secuencia limpia, en la cual se tienen picos bien definidos (erguidos y separados) los cuales no se muestran traslapados. Por otro lado, la línea base de los picos se encuentra completamente plana por lo que dichos aspectos se pueden correlacionar a una correcta asignación de nucleótidos para la secuencia analizada. Por lo contrario, si no se contara con una secuencia limpia se mostrarían picos traslapados, una línea base no plana y nucleótidos con la letra N lo que indicaría que no se le puede asignar un nucleótido debido a alguna contaminación o una mezcla de secuencias.

Figura 37. Preparación de preinóculo e inóculo para realización de curva de crecimiento

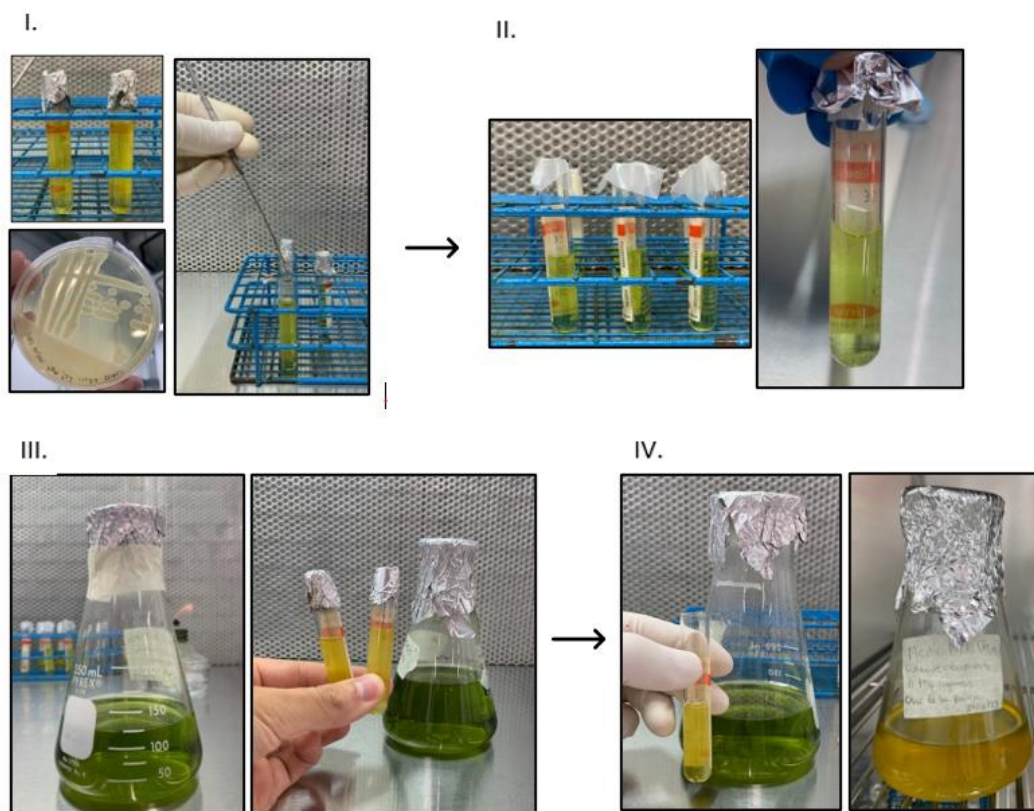
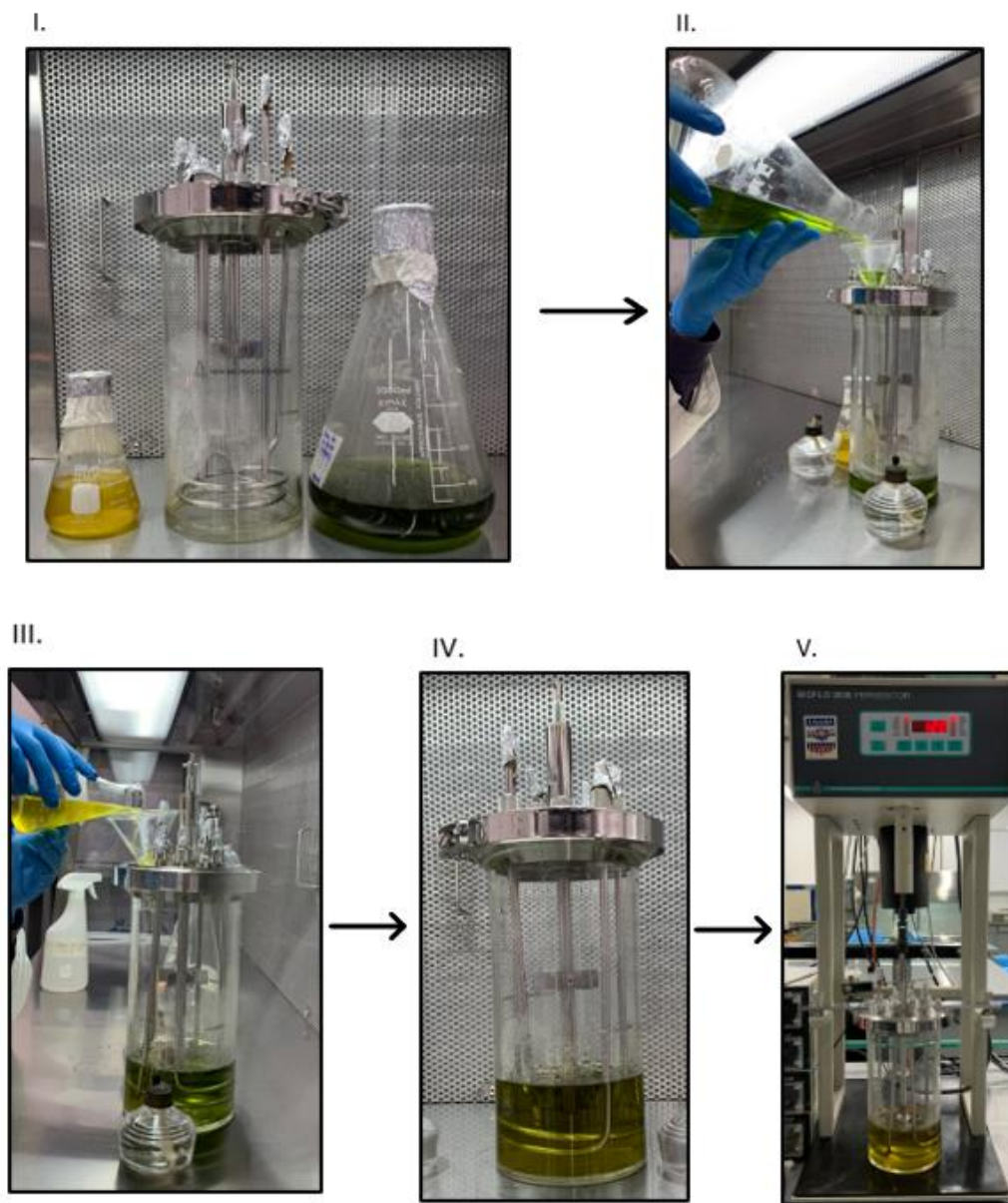


Figura 34. Paso I, Inoculación de bacterias en 4 tubos de ensayo con medio NFB. Paso II, incubación del preinóculo a 37°C durante 72 hr. Paso III, inoculación de Erlenmeyer de 150 ml con preinóculo. Paso IV, Incubación de Erlenmeyer de 150 ml a 37 °C durante 1 semana.

Figura 38. Preparación e inoculación de reactor de 2 litros



*Figura 38. Paso I, Preparación del reactor. Paso II, inoculación del reactor con solución stock medio NFB. Paso III, inoculación de reactor con preinoculo. Paso IV, reactor inoculado. Paso V, instalación del reactor y asignación de parámetros. Temperatura a 37°C y agitación a 150 rpm.*

Figura 39. Cuantificación de la cantidad de nitrógeno atmosférico fijado por bacterias aisladas empleando el kit de Hach.

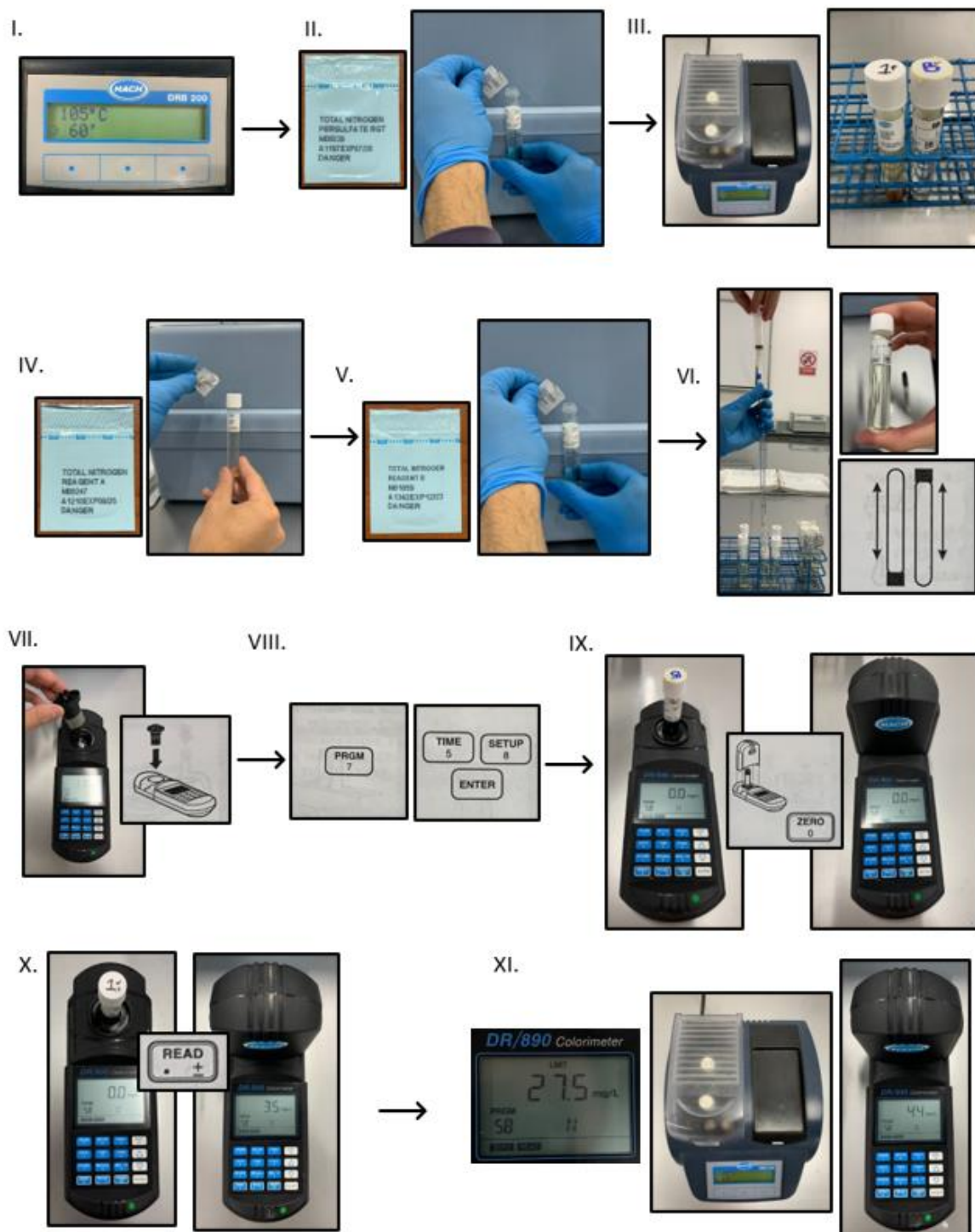


Figura 39. Paso I, encendido de digester. Paso II, preparación de blanco y muestra. Paso III, digestión. Paso IV, adición de reactivo A. Paso V, adición de reactivo B. Paso VI, adición de reactivo C. Paso VII, preparación de colorímetro DR/890. Paso VIII, configuración colorímetro DR/890. Paso IX, medición de blanco. Paso X, medición de la muestra. Paso XI, medición en caso de "Limit".

Figura 40. Conteo celular y medición de la viabilidad de *Bacillus thuringiensis* posterior al tiempo de fermentación

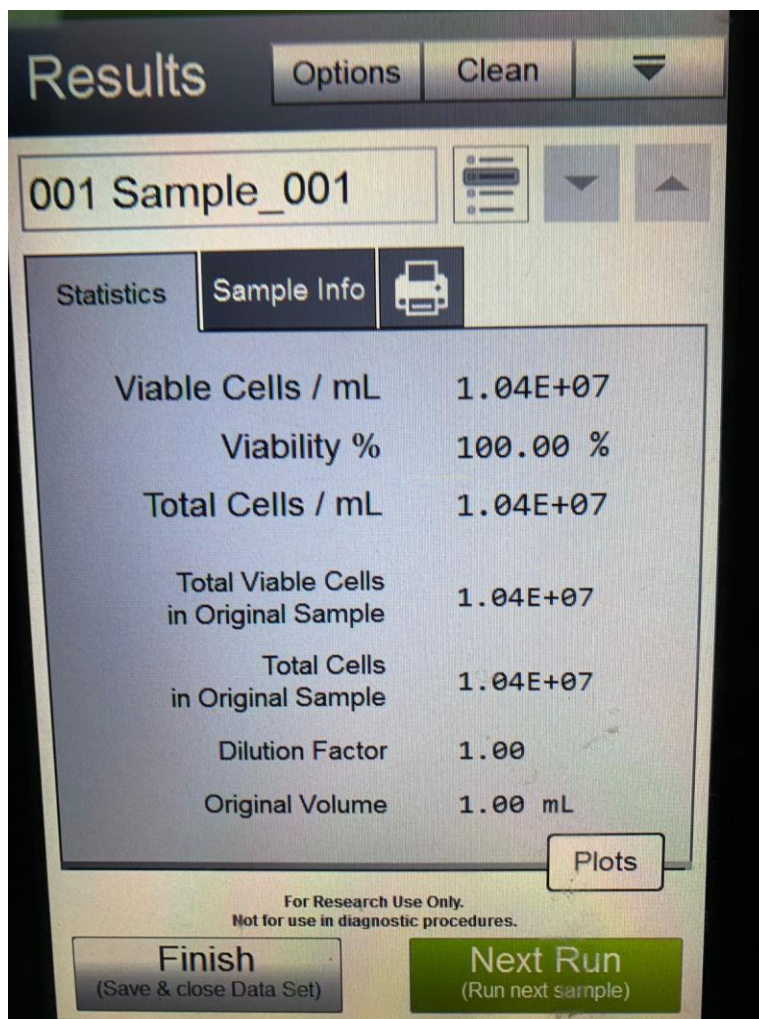


Figura 40. Se evidencian los datos obtenidos del conteo de células vivas y la viabilidad de estas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* mediante el equipo Muse de análisis celular. Esta medición se llevó a cabo posterior a la cuantificación final nitrógeno con el fin de verificar la cantidad de células presentes en el medio de cultivo tras 2 semanas de fermentación.

### XIII. GLOSARIO

- **Bacterias endófitas:** Microorganismos que viven dentro de los tejidos sanos de las plantas, sin causar daño aparente a sus anfitriones. Estas bacterias desarrollan una relación simbiótica con las plantas a lo largo de la evolución, lo que significa que ambos se benefician mutuamente.
- **Bioinoculante:** Producto utilizado en la agricultura y la jardinería para introducir microorganismos beneficiosos en el suelo o en las raíces de las plantas. Estos microorganismos son capaces de promover el crecimiento y la salud de las plantas al establecer interacciones positivas con ellas.
- **Fermentador:** Un fermentador es un equipo o dispositivo utilizado en biotecnología y microbiología para llevar a cabo procesos de fermentación. La fermentación es un proceso bioquímico en el que los microorganismos, como bacterias o levaduras, descomponen compuestos orgánicos, como carbohidratos, en condiciones anaeróbicas (sin oxígeno), para obtener energía.
- **Fijación biológica:** Proceso realizado por ciertos organismos vivos, como ciertas bacterias y plantas, en el cual pueden convertir formas inorgánicas o no disponibles de ciertos elementos en formas utilizables por otros organismos. Por ejemplo, la fijación de nitrógeno es llevada a cabo por bacterias fijadoras de nitrógeno que convierten el nitrógeno atmosférico en una forma que las plantas pueden utilizar.
- **Medios de cultivo:** Un medio de cultivo es una sustancia o combinación de sustancias utilizadas para proporcionar nutrientes y condiciones favorables para el crecimiento y la reproducción de microorganismos en un entorno de laboratorio. Es una herramienta fundamental en microbiología y biología celular para estudiar y propagar diferentes tipos de organismos, como bacterias, hongos, levaduras y células eucariotas.
- **Microbioma:** Comunidad microbiana características que ocupa nichos ecológicos específicos en los cuales se desempeñan variedad de funciones.
- **Reactor:** Es un dispositivo utilizado en biotecnología y microbiología para llevar a cabo procesos biológicos en un entorno controlado. Es similar a un fermentador, pero el término "biorreactor" se utiliza de manera más amplia para describir sistemas en los que se realizan diferentes tipos de procesos biológicos, no solo fermentaciones.
- **Secuenciación:** Proceso mediante el cual se determina el orden preciso de las bases nucleotídicas (adenina, timina, citosina y guanina) en una molécula de ácido nucleico, ya sea ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico). Este proceso permite obtener la secuencia de nucleótidos que conforman la molécula, lo que brinda información importante sobre la composición genética o estructura de la molécula.