

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA



**BACTERIAS ASIMBIOTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO PRESENTES
EN SUELOS AGRÍCOLAS DE LA COMUNA DE CHILLÁN, REGIÓN DE
ÑUBLE.**

OBED ISAÍ VILLEGAS PARRA

HABILITACIÓN PROFESIONAL
PRESENTADA A LA FACULTAD DE
INGENIERÍA AGRÍCOLA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL

CHILLÁN-CHILE

2025

**BACTERIAS ASIMBIOTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO PRESENTES
EN SUELOS AGRÍCOLAS DE LA COMUNA DE CHILLÁN, REGIÓN DE
ÑUBLE.**

Aprobado por:

Pedro Miguel Aqueveque Muñoz
Profesor de Biología, Dr.
Profesor Asociado

Profesor Guía

Luis Antonio Seminario Salas
Ingeniero en Industria Alimentaria, Mg.
Profesor Asistente

Profesor Asesor

Héctor Andrés Valenzuela Bravo
Ingeniero Ambiental, Mg (c).
Colaborador Académico

Profesor Asesor

Gastón Merlet Venturelli
Ingeniero Ejecución Química, Dr.
Profesor Asociado

Director de Departamento

Luis Octavio Lagos Roa
Ingeniero Civil Agrícola, Ph.D.
Profesor Titular

Decano

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la voluntad de estudiar la carrera, a la Universidad de Concepción campus Chillán por ser la sede donde adquirí todos los conocimientos que hoy poseo, a todos y cada uno de los profesores y asistentes de la educación con quienes desarrollé mi formación académica. Dar especial agradecimientos a mi profesor guía, Dr. Pedro Aqueveque Muñoz quien con paciencia y dedicación fue un pilar fundamental para el desarrollo de este trabajo, también agradezco a Héctor Valenzuela e Irma Sepúlveda quienes me dieron su apoyo en el Laboratorio de Microbiología y Micología Aplicada, María Leonor Morales encargada del Laboratorio de Biotecnología Hidroambiental quien también me brindó su apoyo en este proceso.

DEDICATORIA

A mi familia y a todas y cada una de las personas importantes en mi vida, en especial a mis padres Mirtala y Ricardo por todo su apoyo, a mis hermanas y hermanos, Ximena, Débora, Dina, Sara, Vicente, Asbel y Jacob, a mi círculo de amigos de la Universidad, Solange, Marcelo, Daniela S.M, Daniela A, Alan con quienes compartí momentos inolvidables. También dedicarle este trabajo a Christopher, Gregory, Nicolás y Carlos mis cercanos externos a la universidad, finalmente y con mucho cariño a mis segundos padres, Irene y Javier.

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVOS	7
3.1. Objetivo general	7
3.2. Objetivos específicos	7
4. ANTECEDENTES GENERALES	8
4.2. La Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN):.....	9
4.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno:	11
4.3.1. Diazótrofos asociativos no simbióticos (rizosféricos)	11
4.3.2. Diazótrofos simbióticos	12
4.3.3. Diazótrofos de vida libre:.....	12
4.4. Características del suelo:	14
4.5. Área de estudio	16
4.5.1. Suelo cultivado con alfalfa (Universidad de Concepción)	17
4.5.2. Suelo cultivado con maíz (Universidad de Concepción)	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1. Materiales, herramientas y medios.....	19
5.1.1. Para muestreo	19
5.1.2. Para laboratorio	19
5.1.3. Medio de cultivo Burk.....	19
5.2. Toma de muestras	20
5.3. Procesamiento de las muestras	22
5.4. Aislamiento y purificación de colonias.....	24
5.5. Tinción de Gram.....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1. Medición de poblaciones bacterianas	28
6.1.1. Muestreo AP1 y MP1	31

6.1.2. Muestreo AP2 y MP2	33
6.1.3. Muestreo AP3 y MP3	34
6.1.4. Muestreo AP4 y MP4	35
6.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO	36
6.3. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO ENTRE CULTIVOS	51
7. CONCLUSIÓN	61
8. BIBLIOGRAFÍA	63
9. ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

En el texto	Página
Tabla 1. Coordenadas UTM norte y este de la posición de cada punto de extracción de suelo de cultivo de alfalfa correspondientes al muestreo realizado	17
Tabla 2. Coordenadas UTM norte y este de la posición de cada punto de extracción de suelo de cultivo de maíz correspondientes al muestreo realizado	18
Tabla 3. Composición del medio Burk modificado empleado para cultivos de bacterias diazótrofes del estudio.....	20
Tabla 4. Cuantificación de UFC en placas inoculadas con muestras de cultivo de alfalfa durante septiembre 2024 ha enero 2025.	28
Tabla 5. Cuantificación de UFC en placas inoculadas con muestras de cultivo de maíz durante septiembre 2024 ha enero 2025.	29
Tabla 6. Cinética de aparición recurrente de especies presuntivas de diazótrofes en el periodo de estudio para cultivo de alfalfa (<i>M. sativa</i>).....	51
Tabla 7. Recurrencia de especies presuntivas de diazótrofes en cultivo de alfalfa (<i>M. sativa</i>) en el periodo de estudio.....	53
Tabla 8. Cinética de aparición recurrente de especies presuntivas de diazótrofes en el periodo de estudio para cultivo de maíz (<i>Z. mays</i>).....	54
Tabla 9. Recurrencia de especies presuntivas de diazótrofes en cultivo de maíz (<i>Z. mays</i>) en el periodo de estudio.....	56
En el Anexo	
Tabla A1. Caracterización macroscópica de bacterias diazótrofes asimbióticas respecto a su forma, elevación y margen.....	68
Tabla B1. Parámetros climáticos complementarios para el análisis de los días de muestreo en cultivo de alfalfa y maíz.....	68
Tabla B2. Complemento conteo UFC primer muestreo para cultivo de alfalfa con todas las diluciones trabajadas.....	70
Tabla B3. Complemento conteo UFC primer muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajadas.....	70
Tabla B4. Complemento conteo UFC segundo muestreo para cultivo de	71

alfalfa con todas las diluciones trabajas.....	
Tabla B5. Complemento conteo UFC segundo muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajas.....	71
Tabla B6. Complemento conteo UFC tercer muestreo para cultivo de alfalfa con todas las diluciones trabajas.....	72
Tabla B7. Complemento conteo UFC tercer muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajas.....	72
Tabla B8. Complemento conteo UFC cuarto muestreo para cultivo de alfalfa con todas las diluciones trabajas.....	73
Tabla B9. Complemento conteo UFC cuarto muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajas.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

En el texto	Página
Figura 1. Ubicación espacial de los puntos de muestreo en campo de alfalfa (AP).....	17
Figura 2. Ubicación espacial de los puntos de muestreo en campo de maíz (MP)	18
Figura 3. Punto de extracción de muestra de suelo en cultivo de alfalfa donde se muestra el barreno fijado con el martillo a 10 cm de profundidad.....	21
Figura 4. Tubos de ensayo con diluciones seriadas de la muestra de suelo desde 10^{-2} a 10^{-6} bajo campana.....	23
Figura 5. Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) de muestreo MP4 maíz en placa con dilución 10^{-5}	24
Figura 6. Número de UFC en dos suelos de cultivos agrícolas alfalfa y maíz durante septiembre 2024 a enero 2025.....	31
Figura 7. a) Cepa aislada 3AP1 <i>Azomona sp.</i> b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).....	37
Figura 8. a) Cepa aislada 6AP2 <i>Azomona sp.</i> b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).....	38
Figura 9. a) Cepa aislada 14MP2 <i>Azomona sp.</i> b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).....	39
Figura 10. a) Cepa aislada 15MP2 <i>Beijerinckia sp.</i> b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).....	41
Figura 11. a) Cepa aislada 24MP2 <i>Beijerinckia sp.</i> b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).....	42
Figura 12. a) Cepa aislada 4AP2 <i>Azotobacter sp.</i> b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).....	43
Figura 13. a) Cepa aislada 1AP1 <i>Azotobacter sp.</i> b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).....	44

En el texto		Página
Figura 14.	a) Cepa aislada 2AP2 <i>Streptomyces sp.</i> b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).....	46
Figura 15.	a) Cepa aislada 11AP1 <i>Nocardia sp.</i> b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).....	47
Figura 16.	a) Cepa aislada 12MP1 <i>Streptomyces sp.</i> b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).....	48
Figura 17.	a) Cepa aislada 19AP1 <i>Streptomyces sp.</i> b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).....	49
En el Anexo		Página
Figura B1.	Parámetros climáticos de Temperatura (°C) vs Humedad relativa (%) vs Radiación (Mj/m ²) en Chillán los días de muestreo de los cultivos de alfalfa y maíz ubicados en la facultad de ingeniería agrícola.	69

ÍNDICE DE ECUACIONES

		Página
Ecuación 1.	Cálculo de unidades formadoras de colonias por cada gramo (UFC/ ml g).....	26

**BACTERIAS ASIMBIOTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO PRESENTES
EN SUELOS AGRÍCOLAS DE LA COMUNA DE CHILLÁN, REGIÓN DE
ÑUBLE.**

OCCURRENCE OF ASYMBIOTIC NITROGEN-FIXING BACTERIA IN
AGRICULTURAL SOILS FROM CHILLÁN, ÑUBLE REGION.

Palabras claves: Bacterias fijadoras de nitrógeno, Fijación Biológica de Nitrógeno, cultivos agrícolas, biofertilizantes, cinéticas de crecimiento.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de bacterias no simbióticas con capacidad de fijación de nitrógeno en el suelo de dos cultivos agrícolas presentes en la universidad de concepción campus Chillán, ya que estos microorganismos pueden ser utilizados como biofertilizantes mejorando la fertilidad del suelo sin necesidad de fertilizantes sintéticos a través de un proceso denominado Fijación Biológica de Nitrógeno, este se lleva a cabo mediante el uso de un complejo enzimático llamado nitrogenasa que le permite la reducción de compuestos nitrogenados a nitrógeno asimilable que puede ser captado y usado por las plantas. Para encontrar estas bacterias se utilizó el método de muestreo al azar en disposición de zigzag en donde se determinaron cinco puntos de muestreo y a partir de ellos se generó una muestra compuesta en cada cultivo, a partir de esta muestra se realizó el método de diluciones seriadas en el laboratorio para hacer crecer dichas bacterias en placas utilizando medio Burk específico para fijadoras de

nitrógeno, a las colonias emergidas se les realizó el conteo de UFC/g y posteriormente fueron aisladas, caracterizadas y se realizaron comparaciones morfológicas con bacterias obtenidas de otros estudios sobre diazótrofos en revisiones bibliográficas. Aparentemente se obtuvieron 11 cepas diferentes de bacterias entre las que destacan especies como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azomonas* y algunos Actinomicetos. Se determinó que hubo un decrecimiento poblacional en ambos cultivos de alfalfa y maíz debido posiblemente a influencias climáticas y condiciones del suelo, sin embargo, es recomendable ampliar el periodo de estudio para encontrar la causa de estas diferencias en las cinéticas de crecimiento de estas bacterias.

OCCURRENCE OF ASYMBIOTIC NITROGEN-FIXING BACTERIA IN AGRICULTURAL SOILS FROM CHILLÁN, ÑUBLE REGION.

Keywords: Nitrogen-fixing bacteria, Biological Nitrogen Fixation (BNF), Agricultural crops, Biofertilizers, Growth kinetics.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the presence of non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria in the soil of two agricultural crops located at the University of Concepción, Chillán campus, as these microorganisms can be used as biofertilizers to improve soil fertility without the need for synthetic fertilizers, through a process known as *Biological Nitrogen Fixation*. This process is carried out by means of an enzymatic complex called nitrogenase, which enables the reduction of nitrogen compounds to assimilable nitrogen that can be taken up and used by plants. To isolate these bacteria, a random zigzag sampling method was employed, determining five sampling points from which a composite sample was generated for each crop. From these composite samples, the serial dilution method was applied in the laboratory to cultivate the bacteria on plates using Burk's medium, specific for nitrogen-fixing microorganisms. The emerging colonies were quantified in CFU/g, subsequently isolated, characterized, and morphologically compared with bacteria reported in previous bibliographic reviews on diazotrophs. A total of 11 different bacterial strains were apparently obtained, among which species such as *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azomonas*, and some actinomycetes were

identified. It was determined that there was a population decline in both alfalfa and maize crops, possibly due to climatic influences and soil conditions. However, it is recommended to extend the study period to identify the causes of these differences in the growth kinetics of these bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno molecular (N_2) es un elemento esencial para la vida, ya que desempeña funciones estructurales en los organismos y participa en procesos fundamentales como la formación de aminoácidos, proteínas y bases nitrogenadas. En la atmósfera, constituye aproximadamente el 78% del aire, pero en su forma libre y gaseosa es químicamente inerte (Ideagro, 2015). Por ello, solo un grupo selecto de microorganismos especializados puede fijarlo al combinarlo con elementos como el hidrógeno u oxígeno, transformándolo en compuestos como el amonio (NH_4^+) o el nitrito (NO_2^-) en el suelo. Estas formas son asimilables por las plantas, permitiendo su incorporación en el ciclo biológico. Entre los organismos fijadores se encuentran algunas algas, actinomicetos y bacterias (microorganismos diazótrofos) y el proceso mediante el cual reducen el nitrógeno hasta poder ser utilizado se conoce como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). (Ideagro, 2015).

Las principales bacterias con capacidad nitrificadora son bacterias simbióticas (unidas mediante nódulos a las raíces de las plantas, ejemplo género *Rhizobium*) y no simbióticas o de vida libre, se encuentran en el suelo, ejemplo género *Azotobacter*, son bacterias Gram negativas de vida libre, fijan nitrógeno aeróbicamente lo que le da la capacidad metabólica más alta para mineralizar nitrógeno asimilable en el suelo contribuyendo a la disponibilidad de este compuesto. Entre otros beneficios puede estimular los microorganismos

rizosféricos produciendo sustancias inhibidoras de fitopatógenos y es capaz de producir estructuras de resistencia, (Pavone, 2022).

En los últimos años, debido al crecimiento poblacional, la contaminación y las malas prácticas agrícolas, se ha provocado la disminución de la población de diazótrofos en el suelo, generando una disminución de nitrógeno disponible, y con ello las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Para compensar esta pérdida los agricultores han optado por añadir sustrato químico nitrogenado para el crecimiento vegetal (Aguilar, 2015). Las bacterias diazótroficas no simbióticas presentan propiedades no solo para fijar nutrientes de nitrógeno al suelo, sino también poseen la capacidad de revertir o disminuir el impacto de la degradación del suelo por los fertilizantes sintéticos. (Ideagro, 2015).

2. HIPÓTESIS

Los suelos agrícolas de acuerdo con su uso presentan diferencias en la presencia o ausencia de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la presencia de bacterias no simbióticas con capacidad de fijación de nitrógeno en el suelo de dos cultivos agrícolas ubicados en la comuna de Chillán, región de Ñuble.

3.2. Objetivos específicos

- Cuantificar poblaciones de posibles bacterias diazótropas de dos cultivos agrícolas diferentes.
- Aislar y caracterizar muestras de bacterias no simbióticas de cada cultivo.
- Comparar las cinéticas de estas bacterias durante el tiempo en los diferentes suelos.

4. ANTECEDENTES GENERALES

Para comprender de una mejor manera la propuesta de realizar este estudio debemos considerar como se va desarrollando el proceso de fijación desde la base, o sea desde el ciclo del nitrógeno en la naturaleza, la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre y características del área de estudio.

4.1. Ciclo del Nitrógeno:

El ciclo de nitrógeno corresponde a un proceso biogeoquímico que involucra la atmosfera, el suelo, el agua y el medio biótico, el nitrógeno es un elemento no reactivo o inerte debido a su fuerte triple enlace covalente que le entrega una clara estabilidad, por esta razón no puede ser asimilado por las plantas directamente y aquí es donde intervienen los organismos diazótrofes capaces de fijar y transformar el nitrógeno en compuestos bioquímicamente disponibles para el suelo y la vida vegetal. Entre estos organismos se encuentran las bacterias no simbióticas o de vida libre que se analizarán más adelante. (Ideagro, 2015). Este ciclo consta de 4 etapas, Fijación, Amonificación, Nitrificación y Desnitrificación. (Barbosa, 2016).

En la fijación participan procariontes de asociación simbiótica en las raíces de plantas y de vida libre en suelo. El nitrógeno atmosférico (N_2) es captado por dichos organismos y es reducido hasta amoníaco (NH_3). En la amonificación los organismos saprófitos como hongos y otras bacterias degradan los sustratos orgánicos mineralizándolos en nitrógeno inorgánico asimilable para

vegetales y la microbiota produciéndose amonio (NH_4). Posteriormente se lleva a cabo la nitrificación en donde las procariotas realizan dos etapas debido a la falta del mecanismo enzimático completo debería producir nitrato (NO_3^-) a través del amonio. Para la primera parte el amonio se oxida a nitrito (NO_2^-) y luego este último se oxida a nitrato. En la desnitrificación las bacterias realizan el proceso inverso, reduciendo el nitrato a nitrito. Con todos estos procesos se garantiza la disponibilidad bioquímica del nitrógeno para la asimilación de organismos permitiendo el flujo de nutrientes y dando paso a otros procesos como la fotosíntesis o el metabolismo siendo este elemento crucial para el óptimo desarrollo y supervivencia de la vida en el suelo. (Barbosa, 2016).

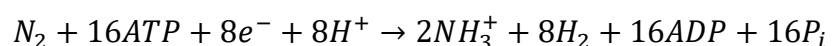
4.2. La Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN):

La Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) se define como un proceso exclusivo de microorganismos diazotróficos como bacterias heterótrofas aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, bacterias quimioautótrofas y microorganismos fotosintéticos como bacterias y cianobacterias. (Halbleib y Ludden, 2000). En este proceso el nitrógeno atmosférico es captado por los diazótrofos reduciéndolo a iones amonio (NH_4^+) o iones nitrato (NO_3^-) mediante el uso del complejo enzimático Nitrogenasa conformado por Fe-proteína y Fe-Mo-proteína siendo el encargado de realizar las reducciones del nitrógeno (Aguilar 2015).

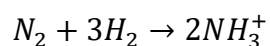
La ruptura y reducción del triple enlace covalente del nitrógeno hasta generar amonio requiere de mucha energía siendo un gasto de 16 a 24 ATP por cada

ion NH_4^+ formado dependiendo del estado y condiciones en la que se encuentre la bacteria involucrada. La simbiosis bacteria-planta utiliza la energía generada por la fotosíntesis del vegetal y esta fijación presenta un 80% más de eficacia, sin embargo, se encuentra limitada por el pequeño grupo de plantas que presentan estas características. Por otro lado, los diazótrofos de vida libre recurren a la materia orgánica como fuente para obtener energía. (Aguilar 2015).

En cuanto a los compuestos y condiciones óptimos para el desarrollo de la FBN, además del ATP, se encuentran la disponibilidad de azufre, hierro, molibdeno, vanadio y manganeso que son parte de la estructura de la enzima nitrogenasa y cumplen con funciones de coenzimas, equilibrio hídrico, protección contra el oxígeno y control de inhibidores. (Aguilar 2015). Siendo necesarios para el correcto desarrollo del proceso, la reacción queda:



Existe un procedimiento similar para la generación de amoníaco para nitrogenados sintéticos, es un método comercial denominado proceso Haber-Bosch:



Se desarrolla en condiciones de 500°C y 350 atm de presión con un gasto energético del 1% del consumo mundial total de energía. El método Haber-Bosh fue desarrollado para aportar el suministro restante que el FBN no puede

cubrir, de un aproximado de 275 millones de toneladas anuales la fijación biológica aporta con 175 millones, la fijación industrial con 70 y 30 millones de toneladas por año corresponde al ciclo biogeoquímico del nitrógeno. (Aguilar 2015).

4.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno:

Como se ha mencionado, existen diferentes especies y tipos de bacterias que posee la capacidad de fijar nitrógeno, éstas se pueden englobar en un grupo más grande denominado bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), entre las cuales se encuentran 87 especies de 2 géneros de archaea, 38 géneros de bacterias y 20 de cianobacterias que son capaces de fijar nitrógeno, y según su relación con la vida vegetal se pueden catalogar como: fijadores de vida libre, fijadores asociativos no simbióticos y fijadores simbióticos, con diferentes requisitos para el desempeño de sus procesos, algunas siendo aerobias o anaerobias facultativas y autótrofas o heterótrofas, pero teniendo en común su capacidad diazótropa gracias a la nitrogenasa (Barbosa, 2016).

4.3.1. Diazótrofos asociativos no simbióticos (rizosféricos)

Infectan plantas en la zona radical sin alterar su morfología, se encuentran en la rizosfera que corresponde la zona próxima a las raíces. Estas procariontas no desarrollan vínculos con los vegetales, se benefician de las sustancias producidas por las raíces. Estos fijadores rizosféricos se asocian a plantas gramíneas como el maíz o arroz y presentan una buena capacidad de fijar

nitrógeno. Entre los géneros de bacterias que corresponden a este mecanismo de fijación se nombran *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*. (Aguilar 2015).

4.3.2. Diazótrofos simbióticos

Asociadas a plantas leguminosas y actinorrizas (pino, olivo, arrayán) ubicándose dentro de nódulos en las raíces de dichas plantas. Como su nombre indica presentan una relación simbiótica o sea ambos organismos se benefician de sus interacciones. Las bacterias captan ácidos orgánicos ricos en carbono y energía, mientras que la planta obtiene compuestos nitrogenados en compensación. Los nódulos se crean a partir de una sustancia flavonoide que es captada por la bacteria en las raíces mediante intercambio de señales químicas activando los genes nod, que da la forma a los nodos. Estos le sirven a las bacterias como zona de crecimiento, protección e intercambio de sustancias con las plantas. Entre este tipo de organismos se encuentran los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella*, bacterias como *Burkholderia* y *Cupriavidus*. (Aguilar 2015).

4.3.3. Diazótrofos de vida libre:

Son los encargados de realizar el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno sin realizar interacción directa con la vida vegetal, proporciona nitrógeno asimilable a todo tipo de plantas, benefician el desarrollo de la zona radicular gracias a sustancias reguladoras de crecimiento entre las que se encuentran

alginatos, poli- α -hidroxibutirato y fitohormonas como: auxinas, citoquininas y giberelinas. (Aguilar 2015).

Estas bacterias necesitan elevadas cantidades de energía para fijar nitrógeno biológicamente. Al captar exudados radiculares de plantas de forma indirecta adquieren un porcentaje de energía y carbono para llevar a cabo su metabolismo. La capacidad de fijación de los procariontes de vida libre es dependiente de la temperatura, el pH, aireación, disponibilidad de nitrógeno combinado, la fuente de carbono, oligoelementos y finalmente la presencia de organismos antagónicos. (Chiriboga y Armijos, 2022).

Estos microorganismos han desarrollado el complejo enzimático nitrogenasa, responsable de la fijación de nitrógeno. Sin embargo, a diferencia de otros organismos fijadores, aquellos de vida libre no entregan directamente el compuesto nitrogenado en una forma asimilable para las plantas. En cambio, estas solo pueden beneficiarse del compuesto nitrogenado una vez que la bacteria muere y ocurre la lisis celular, liberando así el nitrógeno al entorno. Los géneros pertenecientes a este tipo son *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella*. (Aguilar 2015).

Para efectos del estudio se tuvo especial énfasis en las bacterias y organismos de vida libre con la capacidad de fijar nitrógeno.

4.4. Características del suelo:

Los organismos del suelo son buenos indicadores de la calidad y riqueza de la tierra ya que descomponen residuos orgánicos, reciclaje de nutrientes, agregación y síntesis de sustancias y la fijación de nitrógeno. También la estructura y calidad de este depende de la constitución de arena, limo y arcilla que posea. (Chiriboga y Armijos, 2022).

Según su ubicación, Chillán presenta suelos rojo-arcillosos, trumaos y aluviales. Se encuentran entre la zona de la Precordillera Andina y sectores del Valle Central de Riego. Se identifican como suelos de origen volcánico generados por deposición de cenizas sobre un sustrato de vidrio volcánico, combinan los óxidos de silicio con los óxidos de aluminio, o sus derivados, presentan arcillas amorfas no cristalinas de rápida solidificación. Son suelos fértiles en nutrientes como fósforo y ricos en materia orgánica, esto debido a la gran reserva de materia vegetal acumulada a través de ciclos de crecimiento, desarrollo y muerte de plantas. También presentan capacidad de drenaje adecuado, buena actividad biológica y agregados estables conocidos como complejos “arcillo húmicos”, textura franco-limosa y estructura de bloques débiles o migajón, con elevada porosidad y retención de humedad. (Hirzel, 2020)

Estos suelos presentan características como pH entre 5,2-5,8 hasta 6,2-7,0 dependiendo la serie de suelo, siendo suelos algo ácidos. Otras de sus

propiedades físicas se destacan composición de arena 22,2%, limo 51,3% y arcilla 26,5%. (Stolpe, 2006)

Parte de estos suelos se encuentran en una unidad geomorfológica denominada Abanico de Chillán que corresponde a serie de suelo Chacayal y asociado a serie Arrayán. (Stolpe, 2006)

La alfalfa (*Medicago sativa*) corresponde a una planta leguminosa perenne de la familia *Fabaceae* usada como forraje, se cosecha varias veces al año cultivándose entre otoño y primavera. Tiene la capacidad de fijar nitrógeno debido a poseer nódulos radiculares lo que le permite mejorar la calidad del suelo, requiere suelos con buen drenaje y agua, es resistente a las sequias, crece de forma óptima en climas cálidos y entre pH 5,6 hasta 7,5 (Soto, 1992). Por otro lado, el maíz (*Zea mays*) corresponde a un cereal de la familia *Poaceae*, que son las gramíneas utilizada para alimento humano y animal. Requiere suelo con alto drenaje, nutrientes y agua, es vulnerable ante heladas, crece en climas cálidos y se siembra en primavera, el pH del suelo preferible varía entre 5,5 y 7,5. (Antúnez, Vidal, Felmer, 2015).

Para este estudio se realizó una evaluación de especies diazótrofes de vida libre disponibles en dos cultivos agrícolas diferentes de alfalfa y maíz en la comuna de Chillán y como su presencia o ausencia se vio influenciada por alteraciones o interferencias externas.

4.5. Área de estudio

La recolección de muestras fue llevada a cabo en las dependencias de la Universidad de Concepción, próximo a la Facultad de Ingeniería Agrícola, específicamente en cultivos agrícolas. Uno de ellos en barbecho donde antiguamente se sembraba alfalfa, teniendo una superficie de 12.294 m² aproximados donde se harán las pruebas del estudio. En contraste, el otro cultivo estaba iniciando producción de maíz con un área aproximada de 3.586 m². Se determinaron 5 puntos de muestreo como se aprecia en las Figuras 1 y Figura 2, cabe resaltar que los puntos de muestreo alfalfa y maíz fueron utilizados para generar una muestra compuesta y representativa de cada terreno. Se realizaron 40 submuestras que dieron origen a 5 muestras compuestas en 4 oportunidades diferentes en el tiempo de estudio desde septiembre 2024 ha enero 2025. Para la extracción de muestras en cada oportunidad de muestro se realizó en un área circundante a no más de 5 m de cada punto de muestreo fijado para conservar la fidelidad en los datos obtenidos con alfalfa (*M. sativa*). El mismo método se aplicó para la extracción de especímenes de cultivo de maíz (*Z. mays*)

4.5.1. Suelo cultivado con alfalfa (Universidad de Concepción)

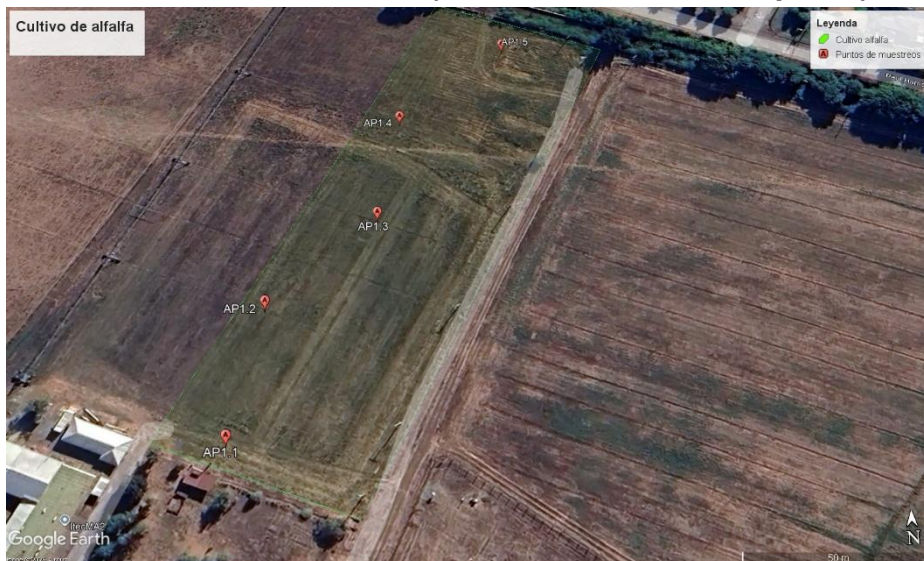


Figura 1. Ubicación espacial de los puntos de muestreo en campo de alfalfa (AP).

Fuente: Google Earth.

Tabla 1. Coordenadas UTM norte y este de la posición de cada punto de extracción de suelo de cultivo de alfalfa correspondientes al muestreo realizado.

Tipo de muestra	Punto de control	Coordenadas UTM (norte)	Coordenadas UTM (este)
Suelo	AP1.1	5946096	761153
Suelo	AP1.2	5946138	761162
Suelo	AP1.3	5946168	761197
Suelo	AP1.4	5946208	761206
Suelo	AP1.5	5946239	761245

Fuente: Elaboración propia.

4.5.2. Suelo cultivado con maíz (Universidad de Concepción)

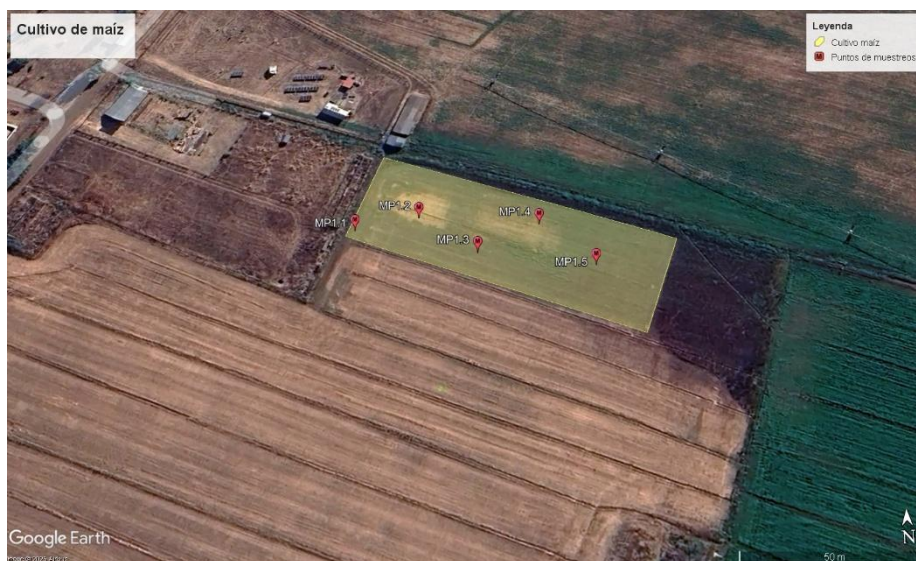


Figura 2. Ubicación espacial de los puntos de extracción en campo de maíz (MP).

Fuente: Google Earth.

Tabla 2. Coordenadas UTM Norte y Este de la posición de cada punto de extracción de suelo de cultivo de maíz correspondientes al primer muestreo realizado.

Tipo de muestra	Punto de control	Coordenadas UTM (norte)	Coordenadas UTM (este)
Suelo	MP1.1	5945964	761268
Suelo	MP1.2	5945967	761289
Suelo	MP1.3	5945952	761307
Suelo	MP1.4	5945961	761328
Suelo	MP1.5	5945944	761344

Fuente: Elaboración propia.

Cada muestreo fue rotulado como AP (alfalfa prueba) o MP (maíz prueba) y el número corresponde al periodo de extracción de muestras, a modo de ejemplo AP1 corresponde al primer muestreo realizado, mientras que AP1.1 hasta AP1.5 son los puntos de control a los que se les extrajo las submuestras que conforman la muestra compuesta.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales, herramientas y medios

La realización del estudio se llevó a cabo utilizando los siguientes materiales y herramientas

5.1.1. Para muestreo

Las principales herramientas para labores de muestreo fueron una pala, barreno muestreador de 15 cm, cuchillo agrológico, martillo y bolsas plásticas.

5.1.2. Para laboratorio

Entre los materiales se utilizaron vaso precipitados de 500 ml, jarro volumétrico (1500 ml), probetas de 10, 100, y 1000 ml, frascos Schott (500 ml), balanzas, gradillas plásticas, tubos de ensayo, placas Petri, campana de extracción, mechero Bunsen, pipetas de diferentes volúmenes, micropipetas 1ml- 200 µl, asa bacteriológica, rastrillo bacteriológico, bisturí quirúrgico, espátula, Parafilm, portaobjetos, cubreobjetos, incubadora ZFD-5090, microscopio estereoscópica Optika, microscopio fotónico Lab-Tec L 2000A, microscopio F-11 Fondef con cámara Moticam, contador de colonias 920A Bantex, tinción Gram.

5.1.3. Medio de cultivo Burk

Es un medio selectivo para el crecimiento de cultivos bacterianos no simbióticos fijadores de nitrógeno como las bacterias del género *Azotobacter*. Contiene fuentes de carbono como glucosa. También pueden crecer otros

tipos de bacterias facultativas que puedan fijar nitrógeno (Flores, Gonzáles, et al. 2014). El medio fue preparado mezclando los reactivos indicados en la Tabla 3 en sus respectivas proporciones. se llevó al autoclave a 121°C por 15 min a 1atm de presión. Se enfriaron y guardaron a 4°C hasta su uso posterior.

Tabla 3. Composición del medio Burk modificado empleado para cultivos de bacterias diazótrofes del estudio.

Componentes (reactivos)	Cantidad (g/l)
K ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	0,2
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
CaSO ₄ *2H ₂ O	0,063
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,091
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,012
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	1,6
Agar	15

Fuente: Elaboración propia.

5.2. Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en las dependencias de la Universidad de Concepción en cultivos de trigo y alfalfa como se mostró en Figura 1 y Figura 2. Para efectos del estudio se empleó muestreo al azar en zigzag que corresponde a una muestra compuesta de submuestras recolectadas de diferentes puntos de recolección para obtener datos más homogéneos y representativos del suelo, se utilizó pala para excavar un agujero de corte en “V” de aproximadamente 20x20 cm con una profundidad de 15 cm aproximados, en donde utilizando un martillo se fijó el barreno muestreador en la tierra a 10 cm de la superficie para obtener 10 g de este (Figura 3). Este

suelo fue depositado en un bolsa de plástico utilizando una espátula especializada, los posteriores puntos de muestreo se realizaron con mismo procedimiento (Arias y Piñeros 2008). Se repitió la técnica durante 4 meses diferentes entre septiembre 2024 y enero 2025 con un total de 40 submuestras distribuidas en 4 muestras compuestas de suelo de alfalfa y 4 de maíz. Los parámetros fisicoquímicos del suelo deben no ser alterados en lo posible pues una pequeña variación en estos puede afectar el equilibrio de la microbiota, evitando contaminar los ejemplares para su posterior análisis. (Chiriboga y Armijos, 2022).



Figura 3. Punto de extracción de muestra de suelo en cultivo de alfalfa donde se muestra el barreno fijado con el martillo a 10 cm de profundidad. Fuente: Elaboración propia.

5.3. Procesamiento de las muestras

Al ser obtenida la muestra compuesta de suelo de cada cultivo se debía aislar las bacterias para ser analizadas, para ello se realizó el método de diluciones seriadas, en donde se usó un vaso precipitado y se acomodó una bolsa con 10 g de muestra que se pesó en una balanza, mezcló y homogenizó con 90 ml de H₂O peptonada esterilizada, posteriormente, en donde se les dispuso 1 ml de muestra con una pipeta de 10 ml a tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada esterilizados, la dilución madre 10^{-1} se le extrajo 1ml que se depositó al siguiente tubo 10^{-2} y a este se le extrajo 1ml para pasarlo al siguiente tubo diluyendo cada vez más la muestra en 10^{-3} , 10^{-4} , etc. Hasta alcanzar la solución deseada 10^{-6} . Dicho de otra forma, a la disolución 10^{-1} se le extrajo 1 ml de muestra que fue trasferida a al tubo 10^{-2} que fue nuevamente agitado y de este se transfirió 1ml de la dilución resultante en sucesión hasta llegar a 10^{-6} (Figura 4). Cabe recalcar que en cada etapa los recipientes fueron flameados en el mechero para evitar la contaminación. (Chiriboga y Armijos, 2022).

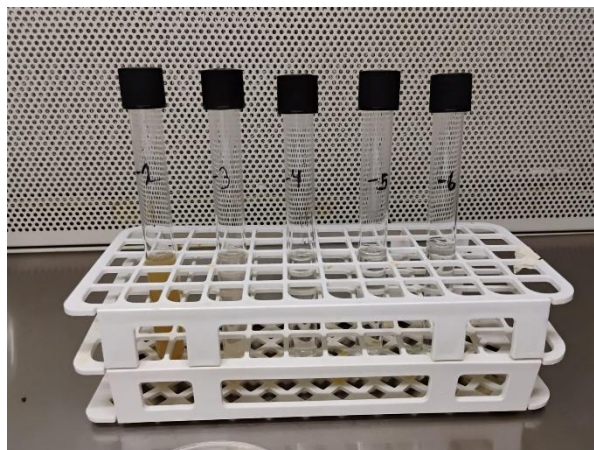


Figura 4. Tubos de ensayo con diluciones seriadas de la muestra de suelo desde 10^{-2} a 10^{-6} bajo campana.

Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente con la ayuda de una micropipeta a cada dilución del proceso anterior se le extrajo 200 μ l (microlitros) para ser depositados en placas Petri con medio de cultivo Burk previamente vertido y solidificado se utilizó un rastrillo bacteriológico para distribuir la muestra diluida de cada serie cubriendo toda la superficie del recipiente con el medio BURk, se realizó un duplicado por cada tubo, después se selló cada placa usando Parafilm y se llevaron a incubar por 72 horas o más dependiendo el crecimiento bacteriano a 28°C. (Chiriboga y Armijos, 2022).

Todos los materiales, medios de cultivo y reactivos utilizados fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min, las placas petri esterilizadas en horno a 180°C por 2 horas.

5.4. Aislamiento y purificación de colonias

Tras revisar las placas transcurrido el tiempo estimado de incubación se determinó si los resultados fueron positivos, de ser el caso las placas se observaron en el contador de colonias 920A Bantex. Donde se contabilizaron los organismos que emergieron, término conocido por las siglas UFC (unidades formadoras de colonias), que corresponde a una unidad de medición microbiológica, como se muestra en la Figura 5. Se marcaron las colonias con un plumón y la maquina al ser sensible a la presión aumentaba el número del conteo automáticamente.



Figura 5. Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) de muestreo MP4 maíz en placa con dilución 10^{-5} .
Fuente: Elaboración propia.

Luego de realizada la labor de recuento de colonias se procedió a calcular las UFC por cada gramo de suelo (ecuación 1). Posteriormente, se compararon los organismos de forma visual para diferenciar y agrupar las colonias con rasgos morfológicos similares. Una vez hecho lo anterior, se rotulan con códigos distintivos las diferentes colonias para continuar con el aislamiento de cada microorganismo en una nueva placa Petri con medio Burk (trabajando bajo campana) en donde se utilizó asa bacteriológica estéril para extraer fragmentos de las colonias que se debían aislar y utilizando la técnica de estriado se inocularon las nuevas placas, se sellaron con parafilm, rotularon y se llevaron a incubar nuevamente por 72 horas o más a 28°C. Este proceso se repitió hasta que las colonias quedaron aisladas y separadas por placas. Una vez aislados los cultivos se agruparon en base a su morfología (Tabla A1, Anexo) y color de las colonias para una caracterización macroscópica (Garzón, 2013). Por otro lado, para la caracterización microscópica se observaron las colonias de acuerdo con la forma de las bacterias y su tinción Gram. (Garzón, 2013). Todos los materiales, medios de cultivo y reactivos utilizados fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min, las placas petri esterilizadas en horno a 180°C por 2 horas. (Chiriboga y Armijos, 2022).

Ecuación 1. Cálculo de unidades formadoras de colonias por cada gramo (UFC/ ml g).

$$\frac{UFC}{g \text{ muestra}} = \frac{N^{\circ} \text{Colonias} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen de muestra inoculada (ml)}}$$

[1]

Donde:

N° colonias = corresponde a la cantidad de colonias contabilizadas.

Factor de dilución = corresponde al inverso de la dilución trabajada

(10⁻⁴; 10000).

Volumen (ml): corresponde al volumen de la dilución inoculada (200 µl; 0,2 ml).

5.5. Tinción de Gram

Corresponde a una tinción diferencial que utiliza dos colorantes empleada en la clasificación de bacterias en dos grupos: bacterias Gram positivas y gram negativas. Los principios de este procedimiento se basan en las características de la pared celular de los microbios, en Gram positivas esta pared está compuesta por una fina capa de peptidoglicano y una membrana celular externa, por otro lado, en Gram negativas presentan una pared celular con una capa gruesa de peptidoglicano sin embargo no poseen membrana celular externa, por lo cual la composición química del peptidoglicano determina las características de tinción. (López, Hernández, et al. 2014)

Para este procedimiento se seleccionó las bacterias aisladas más representativas identificadas a las cuales se les extrajo una porción de colonias y se depositaron en una gota de agua sobre un portaobjetos, se mezclaron para homogenizar y distribuir las bacterias, para posteriormente utilizar el método físico de fijación calor seco, en el cual se expone el portaobjetos brevemente a la flama del mechero hasta desecar la muestra. Una vez teniendo las bacterias fijas se aplicó tinción Gram. Se llevaron al microscopio Lab-Tec L 2000A y se observaron en aumentos 40x, 100x, 400x y algunos casos 1000x usando aceite de inmersión. (López, Hernández, et al. 2014)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos fueron analizados solamente en función de sus características morfológicas macro y micro, siendo asociadas entre si las muestras que presentan parentesco similar. Para efectos de este estudio las colonias que crecieron se consideraron como organismos fijadores de nitrógeno en medio selectivo Burk.

6.1. Medición de poblaciones bacterianas

Posterior a la etapa de inoculación e incubación de las placas Petri con medio selectivo Burk a 28°C por 3-7 días las placas se llevaron para realizar el recuento de los organismos que emergieron como se explicó anteriormente y usando de ejemplo la Figura 5.

Los resultados obtenidos por cada cultivo se muestran en la Tabla 5 y Tabla 6 donde se observan las UFC/g obtenidas de cada muestreo para cada cultivo respectivamente.

Tabla 4. Cuantificación de UFC en placas inoculadas con muestras de cultivo de alfalfa durante septiembre 2024 a enero 2025.

Fecha	Código	UFC/g suelo	Ln (UFC/g)
sept-24	AP1	$7.5 \cdot 10^6$	15,830
nov-24	AP2	$1.6 \cdot 10^6$	14,286
dic-24	AP3	$1.875 \cdot 10^6$	14,444
ene-25	AP4	$8.5 \cdot 10^5$	13,653

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Cuantificación de UFC en placas inoculadas con muestras de cultivo de maíz durante septiembre 2024 a enero 2025.

Fecha	Código	UFC/g suelo	Ln (UFC/g)
sept-24	MP1	$6.0 \cdot 10^6$	15,607
nov-24	MP2	$1.875 \cdot 10^6$	14,444
dic-24	MP3	$2.125 \cdot 10^6$	14,569
ene-25	MP4	$1.1 \cdot 10^6$	13,911

Fuente: Elaboración propia.

La cuantificación de las colonias fue posible gracias al uso de la Ecuación 1, nombrada anteriormente, se usó para cada una de las placas elegidas de los muestreos realizados.

En primera instancia se pudo observar (Figura 6) el crecimiento bacteriano total que hubo en el periodo de estudio desde septiembre del 2024 a enero de 2025, donde se destaca entre cada ocasión de muestreo hubo un “declive poblacional progresivo” en ambos cultivos. En el caso particular de alfalfa (*M. sativa*) se puede notar que en AP1 presentó una población de $7.5 \cdot 10^6$ UFC/g en una época de abundancia en cuanto a lluvias ya que días atrás hubo un aproximado de 22 mm de precipitaciones acumuladas en Chillán con humedad relativa entre 80 a 90% según Agrometeorología INIA, mientras que en las poblaciones obtenidas durante los meses posteriores mostraron una disminución significativa en las colonias registradas alcanzando apenas $8.5 \cdot 10^5$ UFC/g en AP4 al final del estudio en una época de sequía, pues no hubo lloviznas en un tiempo prolongado, sumado a que se denotó que el suelo estaba cada vez más seco pudo significar que las condiciones endófitas del suelo pudieron tener alguna influencia para el desarrollo de las bacterias, ya

que a más humedad y menor radiación las poblaciones eran mayores que cuando se invertían estos valores en épocas más calurosas. Para la siembra de maíz (*Z. mays*) al estar sometido a las mismas condiciones climáticas también tuvo una cinética similar a alfalfa, sin embargo, en este caso para MP1 al momento de muestrear el suelo estaba labrado lo cual podría explicar por qué arrojó $6.0 \cdot 10^6$ UFC/g ya que el suelo superficial al estar más expuesto pudo afectar el crecimiento de colonias a comparación de alfalfa que estuvo inalterado, a partir de MP2 a MP4 se puede notar de que a pesar de pasar por épocas cada vez más secas sus colonias se mantienen ligeramente mayores a las de alfalfa, esto pudo deberse a la irrigación de la siembra ya que para entonces el maíz estaba en plena producción, llegando finalmente a tener $1.1 \cdot 10^6$ UFC/g en la época de mayor sequía para el muestreo MP4, esto plantea una mejor base sobre la influencia de la Humedad en el crecimiento de los diazótrofos. Cada uno de los muestreos realizados serán analizados y comparados entre sí con mayor profundidad en cada periodo de toma de muestras.

Cabe aclarar que se usó los datos obtenidos de las diluciones 10^{-4} en cada muestreo para el estudio, ya que se cumple mayoritariamente la regla de 30-300 individuos a diferencia de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} junto a sus respectivos duplicados (Anexo Tablas B3-B9), así asegurando que los datos obtenidos fuesen más representativos y confiables. (Iañez, 2006).

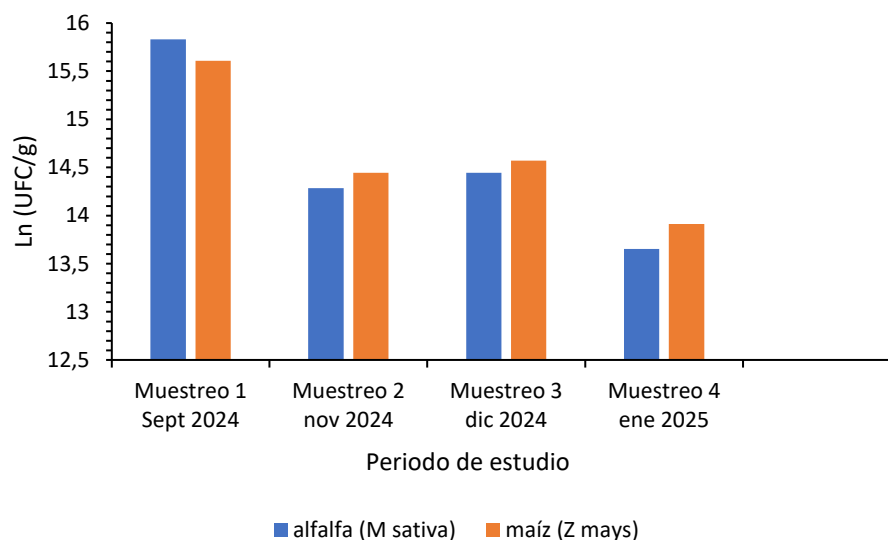


Figura 6. Número de UFC en dos suelos de cultivos agrícolas alfalfa y maíz durante septiembre 2024 a enero 2025.

Fuente: Elaboración propia. Hecho a partir de datos Tablas 5 y 6.

6.1.1. Muestreo AP1 y MP1

Las colonias emergidas en placas del primer muestreo en alfalfa (*M. sativa*) fueron rotuladas como AP1, se pudo notar un número elevado de colonias formadas con un promedio de 150, dando un conteo de $7.5 \cdot 10^6$ UFC/g. Dichos datos fueron evaluados en conjunto con la Tabla B1 sobre parámetros climáticos de los días de muestreo para relacionar una posible dependencia o no dependencia del crecimiento bacteriano con estos fenómenos, esto pudo deberse a que las condiciones meteorológicas generaron óptimas condiciones para el libre crecimiento de estas bacterias en dicha ocasión ya que hubo de 82,4% de humedad y durante días anteriores humedades de 91,2 o 88,7%

incluso el día antes de la recolección hubo precipitaciones acumuladas de 21,8 mm, la radiación solar el día de recolección fue de 45,9 y solo 2 días antes de 27,2 según datos históricos recopilados por Agrometeorología INIA, 2025. Además, el terreno estuvo en barbecho durante algunos años por lo cual la vegetación (entre ellas algunas plantas de alfalfa), las condiciones climáticas favorables y la materia orgánica pudo haber influido en el aumento poblacional de los presuntos diazótrofos (Clavijo, Chipana, et al, 2012). Por otro lado, en el caso de las primeras placas de maíz (*Z. Mays*), nombradas MP1, al momento de la toma de muestras el suelo estaba arado y fertilizado pocos días atrás (posiblemente fertilizantes nitrogenados) ya que se encontraron evidencias de ello, se encontró materia orgánica de cosechas anteriores distribuida por la labranza, además, al tratarse del mismo día que la extracción en alfalfa las condiciones climáticas no variaron por lo cual hubo una alta humedad y radiación solar, baja temperatura, nulas precipitaciones (Tabla B1), habiendo un promedio de colonias de 120 y 6.0×10^6 UFC/g de supuestas bacterias fijadoras de N_2 , además las condiciones climáticas favorables descritas son las mismas, no es tan diferente del resultado anterior mencionado aun existiendo condiciones etapas diferentes en el uso de suelo (uno abandonado y otro en constante producción), no es descartable pensar que el arado y por ende la aireación de la tierra subsecuente sumado a la contenido de nutrientes de la materia orgánica de producción de maíz pudieron generar un breve aumento a corto plazo de las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en la zona ya que como se describió anteriormente

muchos géneros entre ellas *Azospirillum sp* y *Azotobacter sp* son bacterias aerobias diazótrofes, requieren de gran cantidad de energía como fuentes de carbono y oxígeno para la fijación biológica de nitrógeno (Clavijo, Chipana, et al, 2012). y otros procesos metabólicos como la respiración celular.

6.1.2. Muestreo AP2 y MP2

Entre los resultados del segundo muestreo se observó que en los denominados AP2 correspondientes a muestreo de alfalfa (*M. sativa*) hubo una disminución considerable de colonias a comparación del primer conteo realizado decayendo un aproximado de 78,7% en población de bacterias en este cultivo, pasó a tener un promedio de 32 colonias contables y $1.6 \cdot 10^6$ UFC/g suelo en tan solo 2 meses de diferencia, según los datos proporcionados por Red agrometeorológica INIA (2025) expuestos en Tabla B1 (Anexo) indicaron un aumento en la temperatura y radiación asimismo una leve disminución de humedad relativa para los días donde fue ejecutado el segundo muestreo, sin embargo, estos cambios no son lo suficientemente importantes para explicar el brusco descenso en la población de los microorganismos, por consecuente se abordaron datos históricos mensuales de la Red INIA mencionada, en donde se pudo ubicar variables días anteriores a labores de recolección de especímenes como un aumento de $72,3 \text{ Mj/m}^2$ de radiación solar 5 días antes que fueron oscilando entre los días posteriores hasta $59,2 \text{ Mj/m}^2$, se debe considerar que no hubo precipitaciones prácticamente durante las jornadas descritas según agrometeorología INIA

2025. Por lo cual la deshidratación por falta de lluvias junto a la radiación pudieron ser factores clave para la disminución de población entre el muestreo 1 y 2 de este cultivo. Mientras que por el lado de la siembra de maíz (*Z. Mays*) se puede destacar que para el momento de la recolección ya abrían brotes de dicha planta, los valores entregados por las placas MP2 nos arrojó un promedio de colonias de 37,5 y $1.875 \cdot 10^6$ UFC/g suelo, siendo en este caso estadísticas ligeramente mayores a la presentadas por su contraparte, se vio afectado por los mismos parámetros descritos de precipitaciones, humedad y radiación, pero adicionalmente se debe indicar que el suelo se encontraba más húmedo con la posibilidad de que se les aplicó algún fertilizante o pesticida lo que podría haber afectado la aparición de microorganismos. Las aplicaciones excesivas o deficientes de fertilizantes causan contaminación del suelo, aire, agua y por consiguiente el ciclo del nitrógeno, contribuyen a la degradación del suelo por depreciación de las reservas de N_2 . (Guzmán, Montero 2021).

6.1.3. Muestreo AP3 y MP3

Las placas rotuladas como AP3 correspondientes al tercer muestreo en cultivo de alfalfa (*M. sativa*) mostraron crecimiento similar al anterior expuesto (AP2) con 37,5 colonias promedio y $1.875 \cdot 10^6$ UFC/g suelo, lo cual exhibe un aumento minúsculo de crecimiento bacteriano a comparación de su antecesor, según agrometeorología INIA 2025, la humedad se contempló con un 67,3%, radiación de $48,8 \text{ Mj/m}^2$ (hasta $77,2 \text{ Mj/m}^2$ dos días atrás), precipitaciones nulas, siendo condiciones que no favorecen el crecimiento bacteriano

aparentemente. El suelo al momento del muestreo era más duro a comparación del muestreo AP2 por la baja tasa de lluvias en la temporada. En la siembra de maíz (*Z. mays*) se presentó un promedio bacteriano de 42,5 y $2.125 \cdot 10^6$ UFC/g suelo, siendo un aumento poblacional respecto a MP2, sin embargo, las condiciones climáticas no son favorables como se mencionó con anterioridad, en este punto los cultivos fueron irrigados para continuar los objetivos de producción, siendo un aspecto conveniente para el desarrollo bacteriano de este cultivo. La acción de microorganismos diazótrofos puede presentarse solo cuando tienen suficiente humedad y elementos minerales. (Guzmán, Montero 2021).

6.1.4. Muestreo AP4 y MP4

Los resultados obtenidos de la cuarta recolección de especímenes de cultivo de alfalfa (*M. sativa*) fueron 17 colonias promedio y $8.5 \cdot 10^5$ UFC/g suelo, siendo el registro más bajo en conteo del estudio, asimismo siguiendo con la tendencia de disminución de aparición de bacterias fijadoras de nitrógeno como los 2 muestreos anteriores en esta zona, entre los parámetros climáticos destacan precipitaciones acumuladas nulas (durante todo el mes), radiación solar de $46,8 \text{ Mj/m}^2$, el día anterior 73 Mj/m^2 , humedad relativa 53,7%, además ese día se registró la temperatura máxima más alta $33,2^\circ\text{C}$. (Agrometeorología INIA 2025). El suelo al momento del muestreo se encontró muy duro dificultando las labores y la vegetación estaba marchita en ciertas zonas. En contraparte, la siembra de maíz (*Z. mays*) estaba en etapa reproductiva, el

suelo estaba humedecido por la irrigación, bajo las mismos parámetros climáticos anteriormente descritos, entre los resultados obtenidos se encontró un promedio de colonias de 22 y $1.1 \cdot 10^6$ UFC/g suelo, en contraste con AP3 hubo una disminución en la población posiblemente por la maduración de las plantas además de las condiciones climáticas desfavorables, sin embargo, MP4 sigue siendo más alto en comparación a AP4 esta diferencia se pudo generar por el uso de suelo para la producción de éste último. Este comportamiento puede ser atribuido a características fisiológicas de los géneros de estas bacterias fijadoras de nitrógeno, así como a la capacidad de modificar los patrones metabólicos propios de cada género cuando las condiciones edáficas (propiedades del suelo) se alteran, principalmente la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, contenido de humedad, oxígeno. (Obando, Burgos, et al, 2010).

6.2. Aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno

Luego de contabilizar las unidades formadoras de colonias (UFC/g) de las placas AP1; AP2; AP3; AP4; MP1; MP2; MP3 y MP4 se aislaron 20, 28, 11, 9; 14, 24, 15, 13 cepas de microorganismos con supuesta capacidad de fijación de nitrógeno en cada etapa de extracción respectivamente. Aquellos diazótrofos que compartieron características similares en cuanto a su fisiología y algunas propiedades físicas fueron agrupados como un mismo género o taxonómicamente semejante, siendo examinados de acuerdo con algunos métodos descritos en el manual de Bergey's (Holt et al, 1994) entre las que se

destacan morfología de colonias observadas en cuanto a su elevación, margen, forma (Tabla A1, Anexo) y tinción de Gram. Cabe recalcar que no se analizaron el conjunto de 134 cepas en todo el periodo de estudio, sino que fueron agrupadas en grupos más reducidos en los cuales se compartían más características en común macroscópica y microscópicamente, de esas cepas las que presentaron mayor representatividad fueron consideradas para posteriores análisis.

Se encontraron 11 agrupaciones de cepas que cumplen varias de las características descritas como es el caso de la Figura 7.

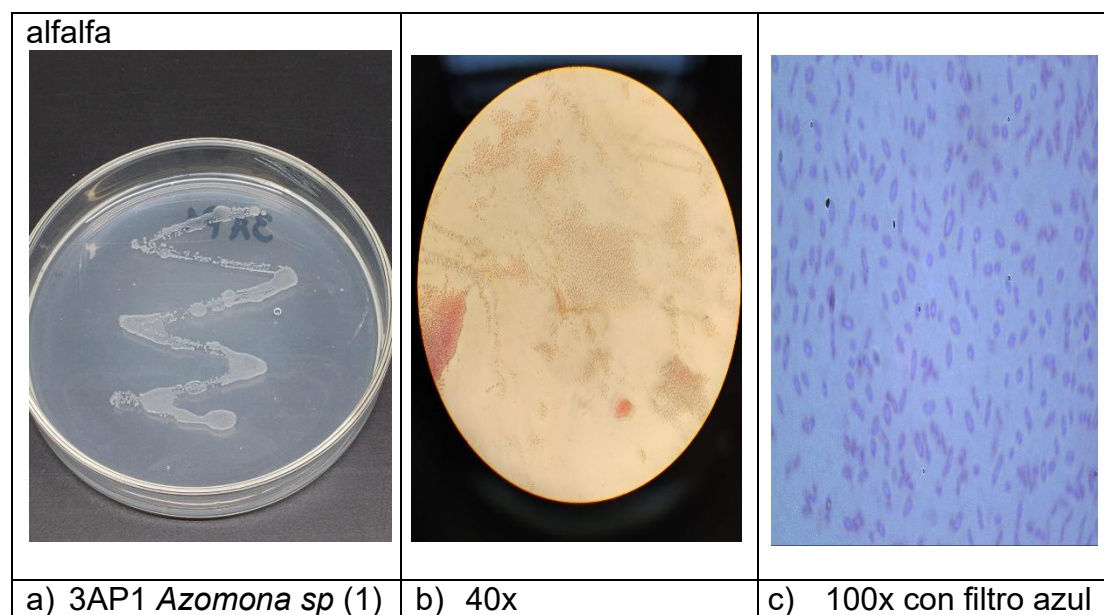


Figura 7. a) Cepa aislada 3AP1 *Azomona sp.* b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

La cepa 3AP1 perteneciente al primer muestreo de alfalfa, se podría aproximar a *Azomonas sp* (1), en la Figura 7 se puede observar que sus colonias presentan un color crema blanquecino, el estriado dificulta la observación correcta, sin embargo, su margen es entero, elevación algo plana, pero debiese ser convexa, y su forma circular y consistencia cremosa. Por otro lado, entre sus características microscópicas destacan colonias coccas u ovoides Gram negativo.

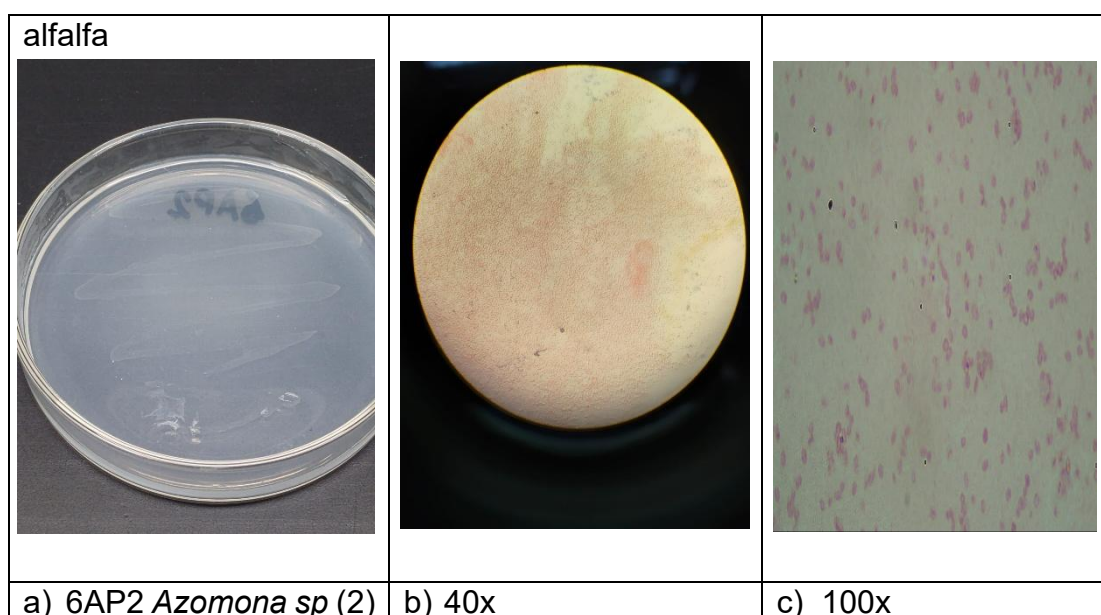


Figura 8. a) Cepa aislada 6AP2 *Azomona sp*. b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

En la Figura 8 se puede observar unas colonias que no coinciden tanto con la descripción anterior, sin embargo, el género *Azomona sp* es el que más se le acerca, presenta colonias translucidas algo blanquecinas, de margen entero y elevación plana y forma circular a pesar del estriado. Contextura cremosa pero

más seca que el caso anterior, entre las características a nivel micro se puede notar que las bacterias son coccas Gram negativas.

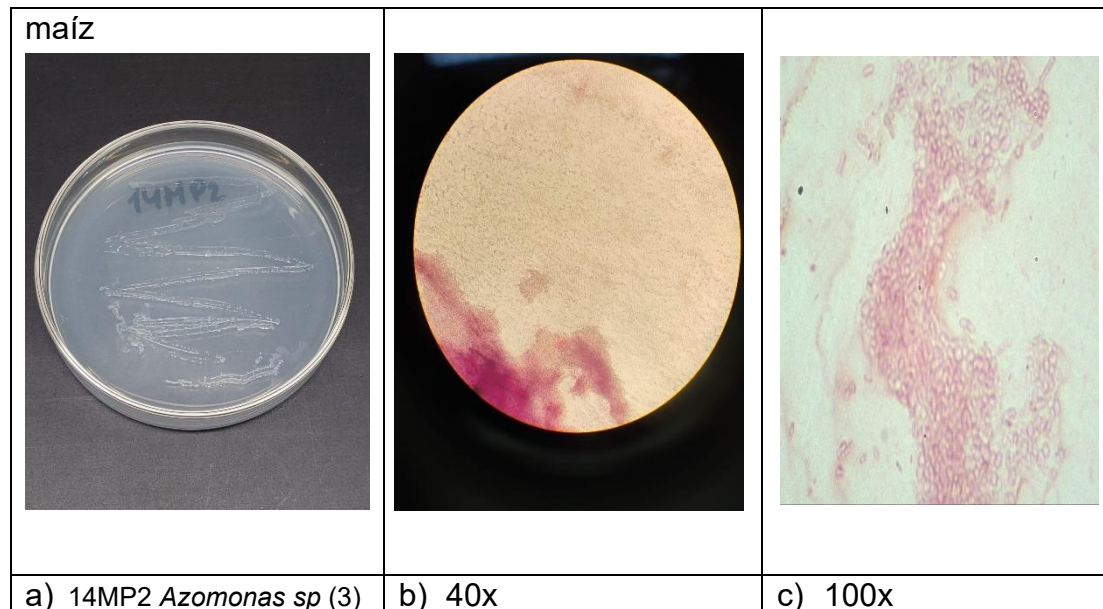


Figura 9. a) Cepa aislada 14MP2 *Azomona sp*. b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

En la Figura 9 se puede observar un cambio respecto a los casos anteriores en el género, ya que se puede analizar que la forma ya no es circular sino irregular, la de elevación entre umbonada y convexa, y margen más ondulado que entero, lo cual indicaría que no debiese tratarse de una *Azomona*, sin embargo, su consistencia es más cremosa que los casos anteriores y la forma de sus bacterias se asemejan mucho a cocos de este género, también presenta tinción Gram negativa.

Azomonas sp está comprendida entre las Azotobacteriaceae que no forman quistes, son bacterias gramnegativas coccas con la capacidad de moverse,

son aerobias y fijan nitrógeno, puede encontrarse mayoritariamente en medios acuáticos, pero también terrestres, puede vivir en ambientes contaminados y ha sido utilizada en la biorremediación de aguas contaminadas con cadmio. (Latt, Yu, et al, 2018).

Cabe destacar que se utilizó la Tabla A1 del Anexo para caracterizar las bacterias anteriormente descritas.

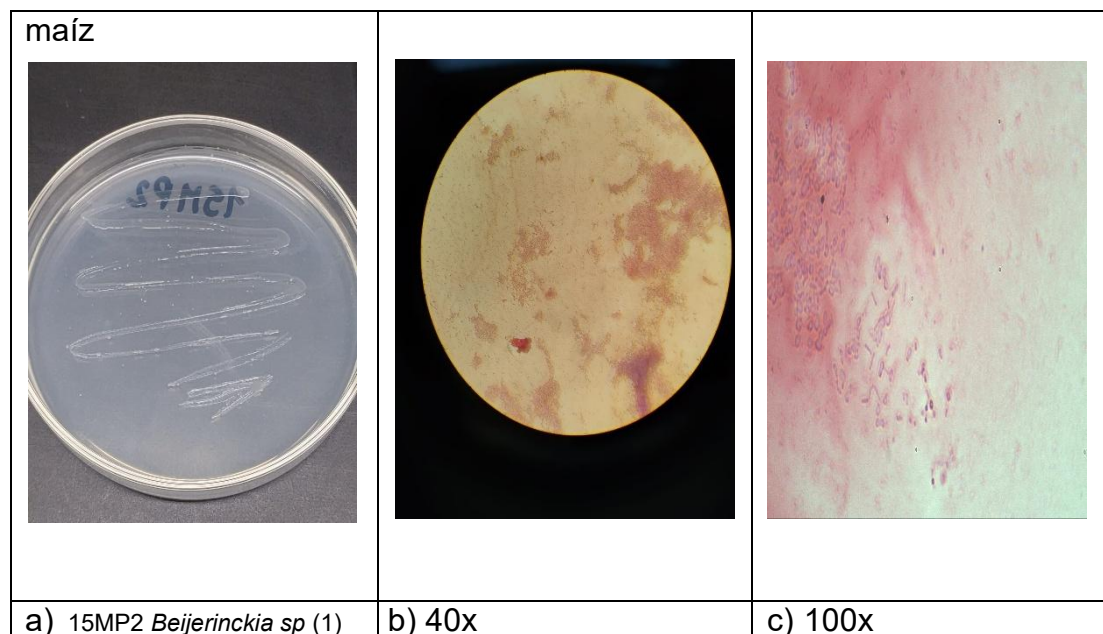


Figura 10. a) Cepa aislada 15MP2 *Beijerinckia sp.* b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-).
Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

En la Figura 10 se puede observar una bacteria aislada del segundo muestreo de maíz, rotulado como 15MP2 siendo la más representativa de su grupo, presenta un color translucido, elevación convexa, bordes enteros, pero algo ondulados y forma lisa circular dependiendo el estriado, tinción Gram negativa, bacterias bacilares con extremos redondeados características del género presuntamente.

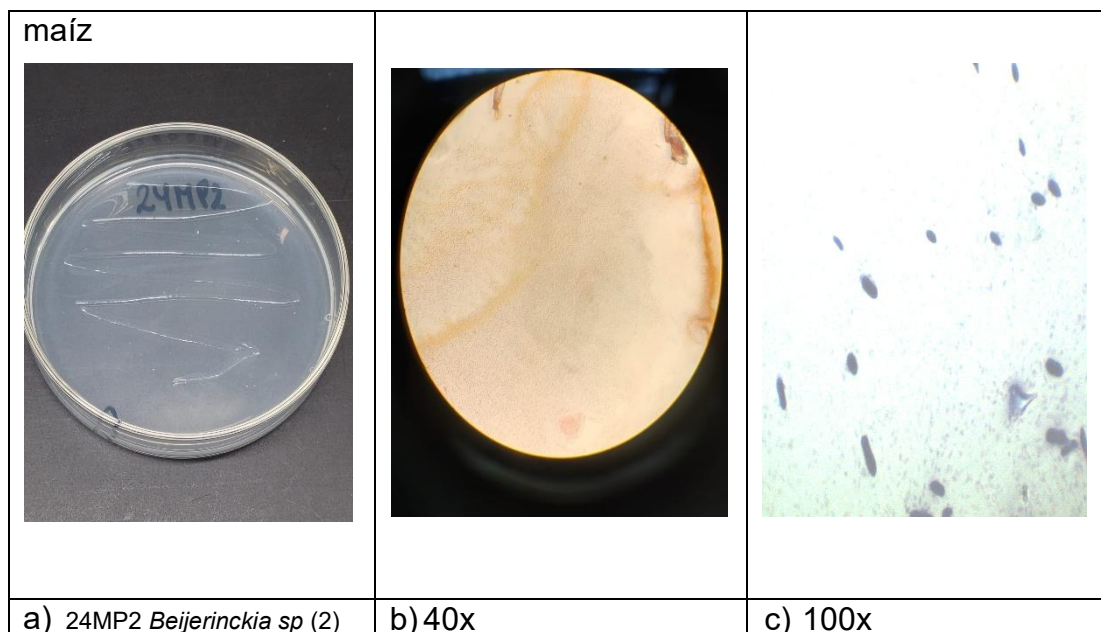


Figura 11. a) Ceba aislada 24MP2 *Beijerinckia sp.* b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-). Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

Para la bacteria *Beijerinckia sp* (2) rotulada 24MP2 del segundo muestreo de maíz se puede apreciar un gran parecido con el caso anterior ya que sus colonias son de forma lisa (circular), borde entero, elevación convexa, color translucido (más que el anterior), sin embargo, a pesar de compartir estas características, a nivel microscópico los bacilos Gram negativos son más pequeños que su antecesor y no se puede distinguir en todos los individuos los extremos redondeados.

El género *Beijerinckia* se caracteriza por fijar nitrógeno, pertenece a la familia Beijerinckiaceae, son bacterias Gram negativas y se caracterizan por sus colonias translucidas, son bacilos y forman extremos redondeados, en cuanto

a su tinción son Gramnegativos aerobios, quimioheterótrofos y puede generar polihidroxi butirato (PHB). (Sari, Amorim, 2025).

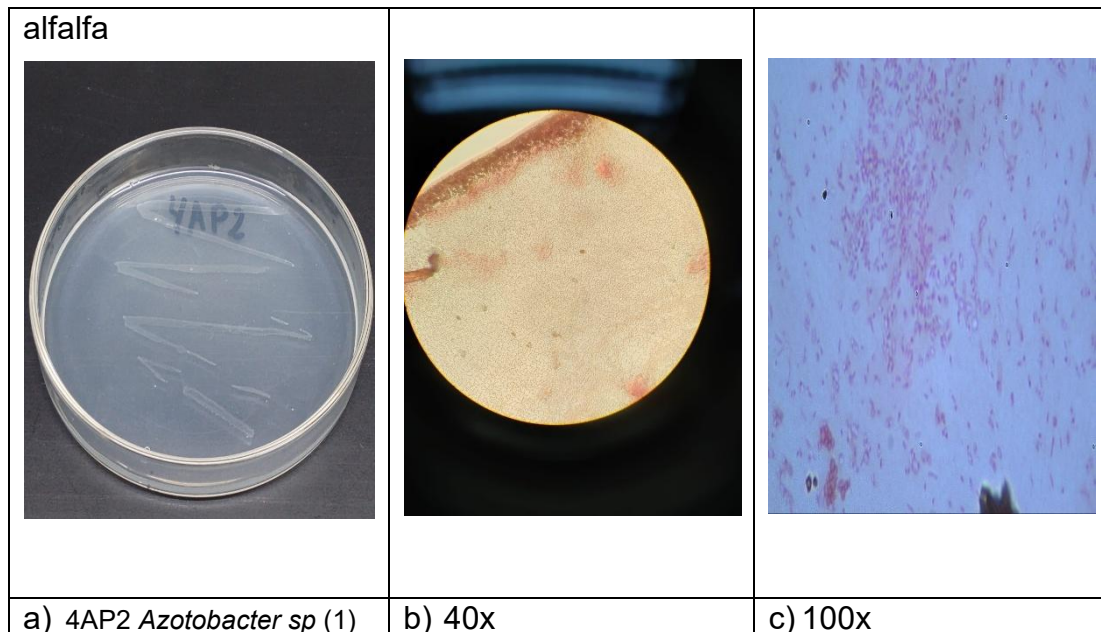


Figura 12. a) Cepa aislada 4AP2 *Azotobacter sp*. b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-). Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

Para presunta *Azotobacter sp* (1) derivada del muestreo 2 alfalfa se demuestra que presenta forma circular, elevación convexa (pero en esta situación algo plana), margen entero, posee contextura cremosa y color blanquecino, sus bacterias son bacilos Gram negativos y al parecer hay formación de “quistes”.

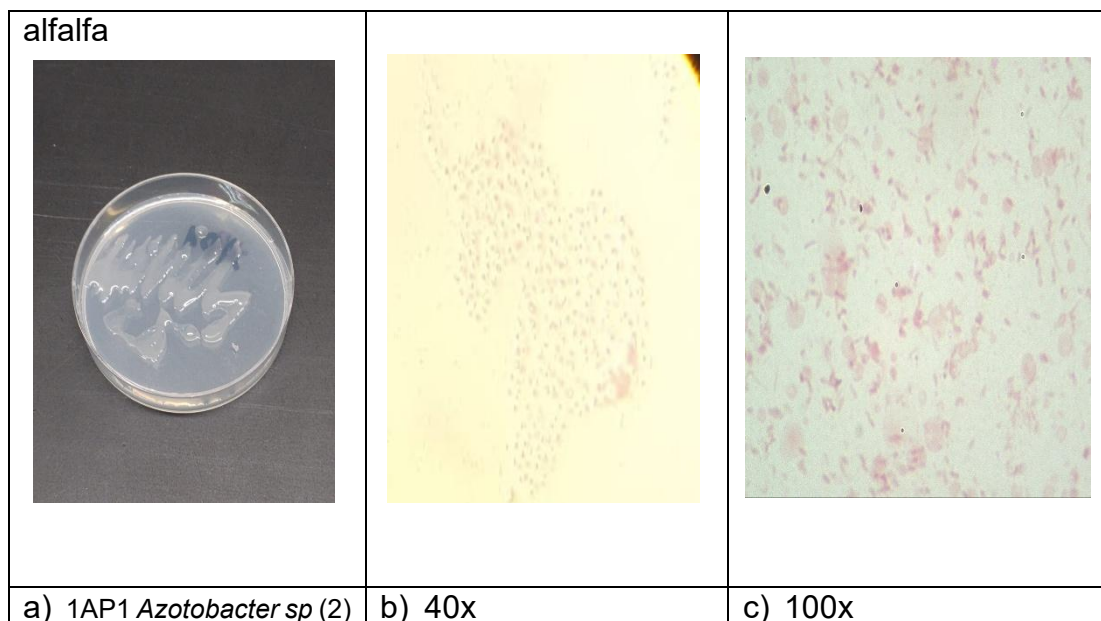


Figura 13. a) Cepa aislada 1AP1 *Azotobacter sp.* b) observada en aumento 40x con tinción Gram (-). c) observada en aumento 100x Gram (-). Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

Para la Figura 13 se muestra unas presuntas *Azotobacter sp* (2) deriva de la primera extracción en cultivo de alfalfa, posible formación de quistes en algunos individuos en su microscopía como en el caso anterior, presenta forma circular, elevación convexa y margen entero, color blanco tornándose marrón claro y consistencia mucilaginosa o viscosa, bajo el microscopio se observan bacilos Gram negativos de tamaño variable algunos cortos y otros largos.

Según Flores y Rodríguez et al, en 2014, dentro de la familia de *Azotobacteraceae* se encuentran las *Azotobacter* y *Azomonas*, diferenciándose entre sí por la formación de quistes, sin embargo, no se pueden diferenciar morfológicamente de otros géneros como *Beijerinckia* o *Azospirillum*, lo cual explica el parentesco entre algunas de las cepas descritas, ya que *Azotobacter sp* corresponden a bacterias gramnegativas

pleomórficas variando desde bacilos hasta bacterias en forma cocal, aerobios y algunos géneros son móviles gracias a flagelos peritricos, en medios libre de nitrógeno (como en el caso del medio Burk) las bacterias jóvenes tienen forma bacilar con extremos redondeados (como sucede con *Beijerinckia sp*) y sus colonias son generalmente lisas, opacas poco convexas y viscosas. Dichas descripciones son compartidas por las diazotrofos presuntivas vistas con anterioridad ya que en general corresponden a bacilos de tinción Gram (-) en el caso de las *Azomonas sp* (1) y (2) no hubo formación de quistes, mientras que *Azotobacter* comparte similitudes con *Beijerinckia sp* (1) con la formación de extremos redondeados. tal como describen estos autores no hay grandes diferencias morfológicas entre estos géneros diazotrofos.

Por otro lado, los quistes de *Azotobacter sp* son formadas por capas de intina y exina (ambas poseen alginato) como mecanismo de protección y resistencia contra las condiciones ambientales como agotamiento de fuente de carbono o deshidratación, estas capas compuestas son posibles responsables de tonos color café en las colonias. Hay géneros que producen cantidades de poli- β -hidroxibutirato (PHB) relacionado con la protección de nitrogenasa en la fijación biológica de nitrógeno, ya que el oxígeno inhibe la acción de la enzima, por lo cual la tasa respiratoria de estos géneros es rápida para disminuir la concentración de oxígeno y no romper el equilibrio entre la respiración celular y la fijación de nitrógeno. (Flores, Rodríguez, et al, 2014).

Además de la fijación de nitrógeno y secreción de amonio al medio, estas especies poseen la capacidad de biodegradar compuestos contaminantes, generar fitohormonas en cultivos, tener efectos antagónicos en hongos y nemátodos, metaboliza compuestos fenólicos como ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, compuestos con alta carga contaminante. (Flores, Rodríguez, et al, 2014)

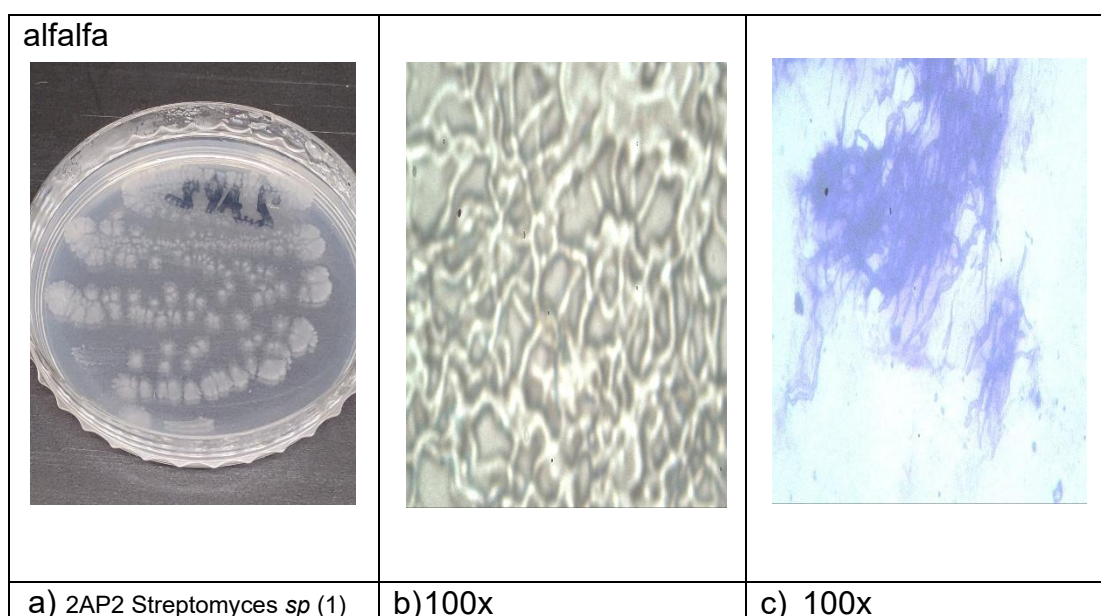


Figura 14. a) Cepa aislada 2AP2 *Streptomyces sp.* b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

En la Figura 14 se puede observar un presunto actinomiceto de género *Streptomyces sp* derivado del segundo muestreo de alfalfa, presenta un color blanco, colonia seca y polvorosa, adherida al agar en forma irregular con bordes filamentosos, bajo el microscopio se observa tinción Gram positiva con crecimiento micelar vegetativo ramificado con presencia de posibles conidios en los filamentos aéreos.

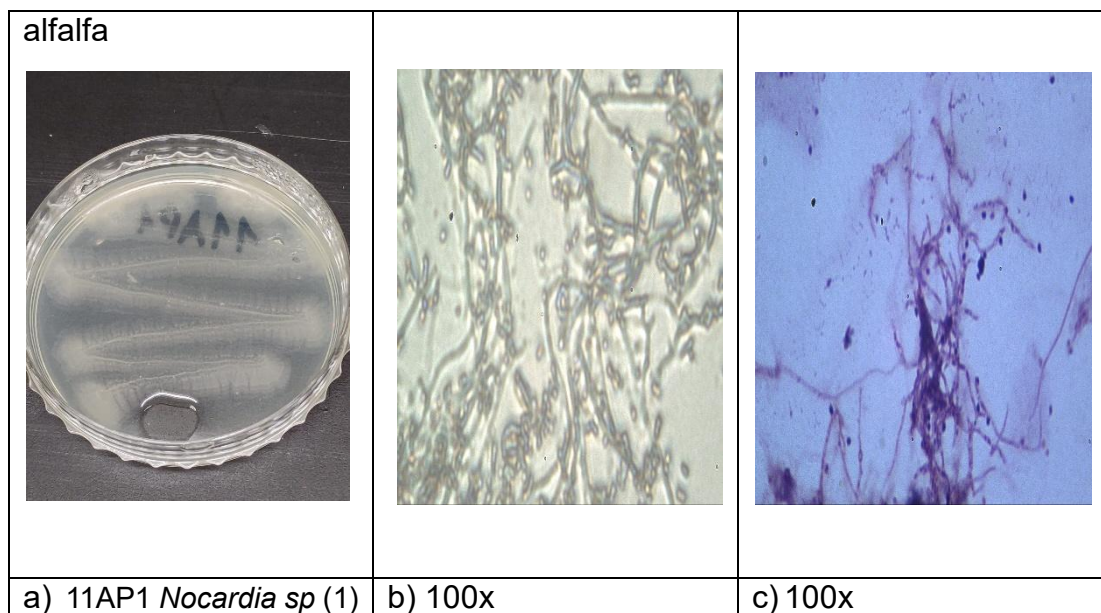


Figura 15. a) Cepa aislada 11AP1 *Nocardia sp*. b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).
Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

El posible diazótrofo rotulado como 11AP1 en la Figura 15 podría corresponder a un actinomiceto del género *Nocardia sp* pero también es posible que pertenezca al género *Streptomyces* por sus rasgos, sus colonias presentan apariencia seca y polvorosa color blanco, de forma irregular (pero diferente al caso anterior, este es un poco más “liso”) adherido al agar y bordes filamentosos, bajo microscopio presenta tinción Gram positiva, crecimiento micelar vegetativo y con presencia conidios.

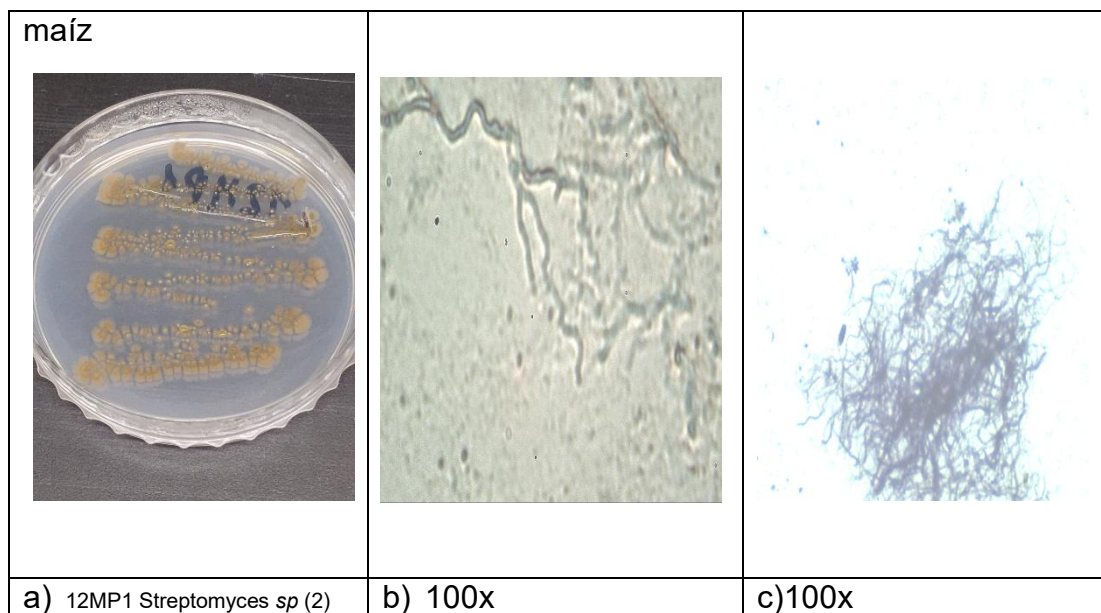


Figura 16. a) Cepa aislada 12MP1 *Streptomyces sp*. b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

En la Figura 16 se puede observar al actinomiceto rotulado 12MP1 como un posible candidato a *Streptomyces sp* (2) ya que su colonia es muy similar al caso *Streptomyces sp* (1) (2AP2) pero de coloración diferente en este caso un café claro, su colonia presenta rasgos secos y polvorosos, adherido al agar de forma irregular y borde filamentoso color beige, a nivel microscópico presenta tinción gram positiva con crecimiento micelar vegetal ramificado poco fragmentado y presencia de conidios en el terminal del micelio aéreo.

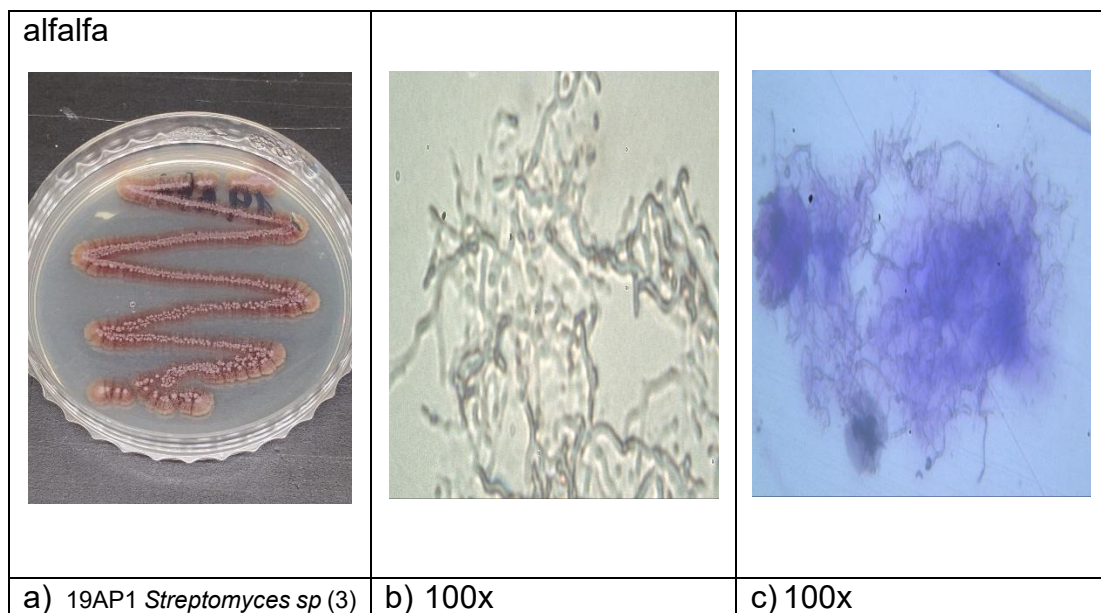


Figura 17. a) Cepa aislada 19AP1 *Streptomyces sp.* b) observada en aumento 100x sin tinción Gram. c) observada en aumento 100x Gram (+).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos.

Para la Figura 17 se puede observar un posible actinomiceto del género *Streptomyces sp (3)* rotulado como 19AP1 derivado del primer muestreo de alfalfa en donde se analiza que posee una colonia seca y polvorosa, adherida al agar de forma irregular (pero más organizada que los casos anteriores), las colonias presentan color rojo y lo que pareciera una elevación “umbonada” con el extremo micelar blanco (filamento aéreo) borde filamentoso color beige. Bajo microscopio se destaca un crecimiento micelar vegetativo ramificado con existencia de conidios, en cuanto a la tinción, corresponde a Gram positiva.

Según lo explicado por Bhandari, Bhattarai et al, 2022, los actinomicetos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios con diversas estructuras químicas y funciones biológicas. Entre esta clase de organismos destacan los *Streptomyces*, dichas bacterias son filamentosas, grampositivas y

esporulantes, características que son cumplidas por los organismos descritos anteriormente.

Un estudio realizado por Uzcátegui-Negrón, Serrano et al, 2009, indica entre sus resultados que el estudio enfocado en Actinomicetes más específicamente del género *Nocardia sp* se aislaron diferentes cepas de actinomicetos en donde predominaron características microscópicas como colonias color beige, color salmón y color blanco (siendo este el más dominante), mientras que entre características macroscópicas destacan crecimiento de colonias sobre la superficie del agar (micelio aéreo), todas las cepas fueron grampositivas, donde se observaron formas coccas, bacilares y filamentos, además de encontrar actinomicetos de género *Rhodococcus* y *Actinomadura* que no fueron de interés para ese estudio.

Estos precedentes podrían acercar aún más a los organismos aislados de los cultivos de maíz y alfalfa del presente estudio para ser identificados con mayor fundamento, ya que se cumplen la mayoría de las características morfológicas, microscópicas, tinción y pigmentación declarados en las muestras 2AP2, 11AP1, 12MP1, 19AP1 y las demás cepas que fueron agrupadas en estos 4 grupos de posibles actinomicetos según los estudios anteriores.

6.3. Cinéticas de crecimiento entre cultivos

Las 11 agrupaciones de supuestos diazótrofos descritos con anterioridad pueden ser relacionadas comparando sus cinéticas de crecimiento bacteriano entre los cultivos, o sea, ver la aparición y/o permanencia de las cepas a lo largo del periodo de estudio en los suelos correspondientes a cada especie vegetal.

Para ello, Tabla 6, Tabla 8 contienen un resumen sobre características macroscópicas y microscópicas de ambos cultivos respectivamente, mientras que Tabla 7 y Tabla 9 muestran la recurrencia de las cepas.

Tabla 6. Cinética de aparición recurrente de especies presuntivas de diazótrofos en el periodo de estudio para cultivo de alfalfa (*M. sativa*).

Géneros presuntivos	Aislamientos cepas más representativas	Características macroscópicas	Características microscópicas
Azomona sp (1)	3AP1, 4AP1, 10AP3	Forma circular, elevación convexa poco plana, margen entero, color blanco	Colonias cocales Gram (-)
Azomona sp (2)	3AP2;5AP2; 6AP2, 6AP3	Forma circular elevación plana, margen entero, color blanquecino	Colonias cocales Gram (-)
Azomona sp (3)	15AP1, 9AP2	Forma irregular, elevación Umbonada, margen ondulado color blanco	Colonias cocales Gram (-)

Continuación tabla anterior

Beijerinckia sp (1)	16AP1;10AP1; 12AP2;2AP3; 9AP4	Forma circular, elevación convexa, margen entero, color translucido	Colonias bacilares con extremos redondeados Gram (-)
Beijerinckia sp (2)	15AP2;1AP3	Forma circular, borde entero, elevación convexa, color translucido	Colonias bacilares de menor tamaño Gram (-)
Azotobacter sp (1)	4AP2; 12AP2; 7AP3;11AP3	Forma circular, elevación convexa, margen entero, color blanquecino	Colonias bacilares Gram (-) con posible formación de quistes.
Azotobacter sp (2)	1AP1;1AP2; 8AP3; 9AP3; 11AP3;5AP4	Forma circular, elevación convexa, margen entero color blanco-marrón	Colonias cocobacilares Gram (-) con posible formación de quistes Crecimiento micelar vegetativo
Streptomyces sp (1)	10AP1;11AP1; 13AP1; 2AP2; 5AP3	Colonia seca, forma irregular, borde filamentosos adherido al agar, color blanco	ramificado, filamentos aéreos y conidios, Gram (+)
Nocardia sp (1)	2AP1; 9AP1; 11AP1;13AP2; 3AP3	Colonia seca, forma irregular, borde filamentosos adherido al agar, color blanco	Crecimiento micelar vegetativo, presencia de conidios, Gram (+)
Streptomyces sp (2)	8AP1; 8.1AP1; 8AP2;5AP3; 4AP3	Colonia seca, forma irregular, borde filamentosos beige adherido al agar, color café	Crecimiento micelar vegetal poco fragmentado, micelio aéreo con presencia de conidios Gram (+)

Continuación tabla anterior

Streptomyces sp (3)	5AP1;6AP1; 12AP1;19AP1; 20AP1;14AP2	Colonia seca, forma irregular, borde filamentoso beige adherido al agar, micelio aereo blanco, color rojo-salmón	Crecimiento micelar vegetativo ramificado con presencia de conidios, Gram (+)
------------------------	---	--	--

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7. Recurrencia de especies presuntivas de diazótrofos en cultivo de alfalfa (*M. sativa*) en el periodo de estudio.

Géneros Presuntivos	Muestreo AP1	Muestreo AP2	Muestreo AP3	Muestreo AP4
Azomona sp (1)	+	-	+	-
Azomona sp (2)	-	+	+	-
Azomona sp (3)	+	+	-	-
Beijerinckia sp (1)	+	+	+	+
Beijerinckia sp (2)	-	+	+	-
Azotobacter sp (1)	-	+	+	-
Azotobacter sp (2)	+	+	+	+
Streptomyces sp (1)	+	+	+	-
Nocardia sp (1)	+	+	+	-
Streptomyces sp (2)	+	+	+	-
Streptomyces sp (3)	+	+	-	-

Fuente: Elaboración propia.

*Donde: (+) corresponde a presencia de bacteria del género respectivo y (-) su ausencia en el muestreo.

Tabla 8. Cinética de aparición recurrente de especies presuntivas de diazótrofos en el periodo de estudio para cultivo de maíz (*Z. mays*)

Géneros Presuntivos	Aislamientos cepas más representativos	Características macroscópicas	Características microscópicas
Azomona sp (1)	13MP1;2MP2; 14MP1;4MP3; 7MP3; 3MP4	Forma circular, elevación convexa poco plana, margen entero, color blanco	Colonias coccas Gram (-)
Azomona sp (2)	2MP1;11MP1; 6MP2;13MP3	Forma circular elevación plana, margen entero, color blanquecino	Colonias coccas Gram (-)
Azomona sp (3)	12MP2;14MP2; 1MP4;4MP4	Forma irregular, elevación Umbonada, margen ondulado color blanco	Colonias coccas Gram (-)
Beijerinckia sp (1)	3MP2; 15MP2;23MP2; 3MP3;6MP3	Forma circular, elevación convexa, margen entero, color translucido	Colonias bacilares con extremos redondeados Gram (-)
Beijerinckia sp (2)	24MP2;8MP3; 2MP4	Forma circular, borde entero, elevación convexa, color translucido	Colonias bacilares de menor tamaño Gram (-)

Continuación tabla anterior

Azotobacter sp (1)	9MP1;5MP2; 1MP3;2MP3	Forma circular, elevación convexa, margen entero, color blanquecino	Colonias bacilares Gram (-) con posible formación de quistes.
Azotobacter sp (2)	7MP2;5MP3; 11MP3; 10MP4	Forma circular, elevación convexa, margen entero color blanco-marrón	Colonias cocobacilares Gram (-) con posible formación de quistes Crecimiento micelar
Streptomyces sp (1)	1MP1;14MP1; 4MP2;9MP2; 16MP2;19MP2; 5MP3;6MP4	Colonia seca, forma irregular, borde filamentoso adherido al agar, color blanco	vegetativo ramificado, filamentos aéreos y conidios, Gram (+)
Nocardia sp (1)	2MP1;7MP1; 8MP3	Colonia seca, forma irregular, borde filamentoso adherido al agar, color blanco	Crecimiento micelar vegetativo, presencia de conidios, Gram (+)
Streptomyces sp (2)	12MP1;3MP3	Colonia seca, forma irregular, borde filamentoso beige adherido al agar, color café	Crecimiento micelar vegetal poco fragmentado, micelio aéreo con presencia de conidios Gram (+)
Streptomyces sp (3)	3MP1; 4MP1; 5MP1; 6MP1	Colonia seca, forma irregular, borde filamentoso beige adherido al agar, posible elevación umbonar blanca, color rojo-salmón	Crecimiento micelar vegetativo ramificado con presencia de conidios, Gram (+)

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Recurrencia de especies presuntivas de diazótrofos en cultivo de alfalfa (*Z. mays*) en el periodo de estudio.

Géneros Presuntivos	Muestreo MP1	Muestreo MP2	Muestreo MP3	Muestreo MP4
Azomona sp (1)	+	+	+	+
Azomona sp (2)	+	+	+	-
Azomona sp (3)	-	+	-	+
Beijerinckia sp (1)	-	+	+	-
Beijerinckia sp (2)	-	+	+	+
Azotobacter sp (1)	+	+	+	-
Azotobacter sp (2)	-	+	+	+
Streptomyces sp (1)	+	+	+	+
Nocardia sp (1)	+	-	+	-
Streptomyces sp (2)	+	-	+	-
Streptomyces sp (3)	+	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

*Donde: (+) corresponde a presencia de bacteria del género respectivo y (-) su ausencia en el muestreo.

En la sección de medición de población bacteriana se pudo observar que hubo una diferencia decreciente significativa hasta estadística entre las cantidad de colonias contabilizadas del primer muestreo con las del último, esto posiblemente se debió a condiciones climáticas o edáficas favorables o desfavorables en las instancias de recolección de especímenes, principalmente humedad, radiación, pH o textura del suelo pudieron influir en

la proliferación o disminución de estas poblaciones, por otro lado, las condiciones en el laboratorio fueron controladas para propiciar un ambiente favorable en el crecimiento bacteriano, sin embargo, no todas las cepas descritas aparecieron o permanecieron a lo largo de todo el periodo de estudio, por ejemplo *Azomonas sp* (1) en alfalfa solo estuvo presente en AP1, AP3, mientras que en maíz estuvo en todas MP1, MP2, MP3, MP4, *Azomonas sp* (2) para alfalfa estuvo en AP2 y AP3, mientras que en maíz solo se ausentó en MP4, *Azomonas sp* (3) alfalfa con aparición en AP1 y AP2, en contraposición maíz solo estuvo MP2 y MP4, según Latt, Yu, et al, 2018, *A. agilis* es una bacteria diazótropa con potencial para generar biorremediación de suelos como plantaciones agrícolas arroceras en regiones de Birmania, sin embargo, su potencial de fijación de nitrógeno se ve afectado por la salinidad del suelo, en particular NaCl, por lo cual recomiendan utilizarlas en suelos agrícolas no contaminados por altos niveles de sales para no alterar su alto potencial de fijación de nitrógeno o degradación de residuos agrícolas. El maíz al ser una planta de la familia Poaceae como el arroz podría ser más afín a este género, lo que puede explicar el por qué tiene más presencia en estos cultivos, sin embargo, se debe estudiar más a fondo las propiedades edáficas de ambos suelos para comparar el nivel de salinidad de cada uno.

Para los fijadores de nitrógeno del presunto género *Beijerinckia sp* (1) en plantación de alfalfa se destaca la permanencia de esta cepa a lo largo del periodo de estudio abarcando desde AP1, AP2, AP3 y AP4, a comparación de

maíz en donde solo marca presencia en MP2 y MP3, en el caso de *Beijerinckia sp* (2), aparece solo en AP2 y AP3, en contraste con MP2, MP3 y MP4 correspondientes a siembra de gramínea estudiada. Paralelamente se encuentra *Azotobacter sp* (1) que en el cultivo en barbecho de la leguminosa del estudio emergieron cepas en AP2 y AP3, para el otro cultivo brotaron en MP1, MP2 y MP3, entre las cepas obtenidas de *Azotobacter sp* (2) se presenciaron en todas las instancias de muestreo desde AP1 hasta AP4, en cultivo de maíz solo se ausentó en MP1. Según el estudio realizado por Sari, Amorim, 2025, se aplicaron múltiples tratamientos bacterianos a plantas de espinaca roja con *A. chroococcum* y *B. indica* (y una combinación de ambos) en donde no hubo un efecto significativo en el crecimiento de la planta, sin embargo, tuvieron un avance en qué cepa podría ser más eficaz para mejorar el desarrollo de estos vegetales en donde *B. indica* tuvo un mejor desempeño en promover la altura promedio de la planta con un 26, 75 cm a comparación de *A. chroococcum* con 24, 85 cm. A pesar de que *A. chroococcum* es un diazótrofo no simbiótico con gran capacidad de fijación de nitrógeno, *B. indica* tuvo un desempeño superior en promover el crecimiento vegetal, el factor crucial que contribuyó a este resultado fue la naturaleza acida del suelo (pH4-4,5) donde se sembraron ya que en contraste la especie de *Azotobacter* crece de forma óptima en suelo con pH neutro o ligeramente alcalino 7,0-7,5. Esto genera una disyuntiva, debido a la posible presencia de bacterias de la familia *Azotobacteraceae* (*Azomonas sp* y *Azotobacter sp*) es complejo que puedan coexistir junto a los miembros de la familia *Beijerinckiaceae* (*Beijerinckia sp*)

dadas las condiciones óptimas de desarrollo de cada una de estas especies y de las condiciones endófitas del suelo, Stolpe en 2006 clasificó los suelos de Chillán en donde destacaba la serie Chacayal asociada a serie Arrayan, con pH entre 5,2-5,8 ó 6,2-7,0 dependiendo el tipo de suelo en específico, es probable que otros tipos de suelo estén presentes entre los cultivos o que limiten entre sí, pudiendo traer consigo otras propiedades endófitas.

Flores y Rodríguez et al, en 2014, mencionaron que morfológicamente *Azotobacter sp* no se distingue significativamente de *Beijerinckia sp*, inclusive que comparten algunas características muy similares (dependiendo de la especie) como extremos redondeados, hasta hace unos años *Beijerinckia* se encontraba dentro de la misma familia que *Azotobacter*, hasta que la asociaron a una nueva familia, teniendo estos antecedentes, no es descartable que las supuestas especies encontradas pertenezcan a una misma clasificación o sea a la familia Azotobacteraceae, debido a que este estudio se basó principalmente en características morfológicas, teniendo muchas de éstas similitudes, por lo cual es necesario hacer un análisis de biología molecular para determinar correctamente a qué género pertenece cada espécimen recolectado (ARNr 16S).

Un estudio realizado por Castellanos, Burgos, et al, 2010, indicó que bacterias diazótroficas pertenecientes a diferentes géneros entre ellos *Azotobacter* y *Beijerinckia* en dos épocas climáticas analizadas mostraron crecimiento poblacional homogéneo, estas muestras aisladas a partir de suelo rizosféricos

asociados a *Eucalyptus sp* no tuvieron diferencias significativas en densidad en periodos de sequía y lluvia, se atribuyó a características fisiológicas de los géneros cuando las condiciones edáficas se alteran, por lo cual se vuelve a recalcar la importancia de las condiciones del suelo y también el tipo de cultivo donde se pueden encontrar dichas bacterias debido a como se adaptan al estrés para proliferar.

Para los Actinomicetos se puede mencionar que su ocurrencia entre los periodos de estudio para alfalfa son mayores que en maíz, ya que *Streptomyces sp* (1), *Nocardia sp* (1), *Streptomyces sp* (2) en siembra de alfalfa solo se ausentan en AP4, periodo más complejo en cuanto a condiciones climáticas y baja humedad, *Streptomyces sp* (3) solo está presente en AP1 y AP2, en contraste para siembra de maíz *Streptomyces sp* (1) aparece en todos los muestreos, *Streptomyces sp* (2), *Nocardia sp* (1) solo en MP1 y MP3, y *Streptomyces sp* (3) solo está presente en MP1, lo que indica que posiblemente este actinomicete es susceptible a cambios de humedad/temperatura, mientras que los demás toleran mejor las condiciones de estrés sobre todo *Streptomyces sp* (1), que es el que más permanece. Actualmente no hay muchos registros que apoyen que géneros como *Streptomyces sp* puedan fijar nitrógeno activamente, al no poseer complejo nitrogenasa, sin embargo, si posee genes *nifH* inactivos, por lo cual es necesario realizar más estudios referentes a esta familia y género en específico. (Gtari, Nouioui, et al, 2012).

7. CONCLUSIÓN

A partir de los hallazgos y revisión de las características morfológicas sobre los posibles diazótrofos encontrados en este estudio podemos concluir en primer lugar que entre el periodo de estudio desde septiembre 2024 hasta enero 2025 los conteos de colonias a partir de las muestras hechas en ambos cultivos alfalfa y maíz fueron disminuyendo sus poblaciones progresivamente ya que al inicio mostraron índices de $7.5 \cdot 10^6$ y $6.0 \cdot 10^6$ para *M. sativa* y *Z. mays* respectivamente, decreciendo hasta $8.5 \cdot 10^5$ y $1.1 \cdot 10^6$ en cada cultivo, estos resultados obtenidos se debieron posiblemente a la influencia de humedad y radiación o condiciones endófitas del suelo, el primer muestreo se dio en una temporada de muchas lluvias y poca radiación según Agrometeorología, mientras que en los últimos muestreos se denota una sequía prolongada donde no hubo lluvias en semanas además de altos niveles de radiación, la capacidad de retención de humedad del suelo también pudo jugar un papel importante para la proliferación de estas bacterias en la zona. Se obtuvo un total de 11 posibles cepas aisladas, entre las que destacan 3 cepas de *Azomonas*, 2 *Beijerinckia sp*, 2 *Azotobacter sp* y 4 posibles actinomicetos entre los cuales hay 3 especies de *Streptomyces* y 1 *Nocardia*, en el caso de cultivo de maíz las cepas que más aparecieron en el periodo de estudio fueron *Azomona sp* (1); *streptomyces sp* (1) en todos los muestreos, seguidos de *Azomona sp* (2), *Azotobacter sp* (2) y *Beijerinckia sp* (2) en 3 muestreos, las especies de *Azomonas* se pudieron ver beneficiadas debido a la irrigación en

las plantas de maíz debido a que son microorganismos de ambientes más húmedos, en cambio, para alfalfa las especies con mayor aparición corresponden a *Beijerinckia sp* (1) y *Azotobacter* (2) en todo el periodo entre los actinomicetos el único que solo apareció en 2 muestreos fue *Streptomyces* (3) mientras que los demás estuvieron en 3 muestras. Las *Azotobacter* se caracterizan por su resistencia ante la desecación con el mecanismo de los quistes de alginato, *Beijerinckia* podría tener capacidades similares haciendo de estas las candidatas óptimas para resistir las condiciones no tan favorables del suelo de alfalfa. La única especie que estuvo en los primeros 2 muestreos o menos en todas las muestras fue *Streptomyces* (3). Cabe recalcar que los presuntos diazótrofos y actinomicetos encontrados pueden o no poseer la capacidad de FBN, sin embargo, se requiere estudios genéticos al respecto.

Finalmente se puede decir que si bien, existen diferencias entre la aparición o ausencia de diazótrofos de vida libre según el uso del suelo agrícola, ya que en cada cultivo había predominancia de cepas de bacterias por sobre las demás, no es un factor determinante porque la influencia climáticas o condiciones endófitas del suelo también son de importancia para el desarrollo de estos organismos, por lo cual sería recomendable ampliar el periodo de estudio a más meses o en temporadas de sequía y lluvia, para obtener resultados que den mejores convicciones.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Palazón Pedro, Ideagro. (2015). Bacterias fijadoras de nitrógeno en agricultura, alternativa al uso de fertilización nitrogenada inorgánica - Ideagro. <https://ideagro.es/bacterias-fijadoras-de-nitrogeno-en-agricultura-alternativa-al-uso-de-fertilizacion-nitrogenada-inorganica/>
- Aguilar Borja María B. (2015) Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres. Tesis de título de Ingeniera Bioquímica. Universidad Técnica De Ambato-Ecuador. repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/7231f4d2-8635-4235-b0f7-7f526ffcdf07/content
- Barbosa López Y. (2016). Caracterización de la diversidad metabólica de la comunidad microbiana y el grupo funcional de bacterias desnitrificantes en la rizosfera de la especie *portulaca oleracea* en suelos de uso agrícola. Tesis de título de Bacterióloga. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Manizales. <https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/1401/6/YEISY%20DAYANA%20BARBOSA%20LOPEZ.pdf>
- Halbleib Cale y Ludden Paul (2000) Regulation of Biological Nitrogen Fixation. Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison, Madison. <https://pdf.sciencedirectassets.com/782859/1-s2.0-S0022316600X30052/1-s2.0-S0022316622140447/main.pdf>
- Chiriboga Hugo y Armijos Jennifer. (2022). Caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno (N₂) de vida libre, provenientes de cultivos comerciales de cacao y maíz. Tesis de título biólogo. Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Guayaquil, Ecuador. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/55830/1/T-112330%20Chiriboga-Armijos.PDF>
- Garzón Obando, D. C. (2013). Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida. Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/b4444a86-72d3-42a0-b157-5268707ee91c/content>

- Pavone Domenico (2022). Artículo de divulgación “Azotobacter en la agricultura: Una bacteria biofertilizante que protege a las plantas.” Tecnovita Biotecnología e innovación para el Desarrollo sostenible. <https://tecnovitaca.com/wp-content/uploads/2022/12/Azotobacter.pdf>
- Hirzel C., Juan (2020). Suelos de la Región de Ñuble: caracterización general [en línea]. Chillan: Colección Libros INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 39. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/3626>
- Stolpe B., Neal (2006). Descripciones de los principales suelos de la VIII Región de Chile [en línea]. Chillán, Chile: Trama Impresores S.A.. Publicaciones - Departamento de Suelos y Recursos Naturales. N° 01. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/56740>
- Soto O., Patricio (1992). Técnicas agronómicas para el cultivo de la alfalfa, adaptación y establecimiento [en línea]. Temuco: Serie Carillanca. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/30736>
- Antúnez B., Alejandro, Felmer E., Vidal S., Marcelo, Sofia (eds.) (2015). Riego por pulsos en maíz grano [en línea]. Arica: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 312. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7892>
- Arias C. Lorena y Piñeros E. Paola. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde. Tesis de título microbiólogas industriales. Facultad de ciencias, Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis2_26.pdf?sequence=1
- Flores G. Adriana C., Gonzáles V., Aguilar N. Cristobal, Rodríguez H Raúl. (2014) Biofertilizantes microbianos primera edición. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México. https://www.researchgate.net/publication/274638111_Azotobacter_una_bacteria_con_potencial_como_biofertilizante_eco-amigable





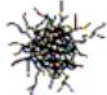








- López Jácome L.E, Hernández Durán M, Colín Castro CA, et al. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*. 2014;3(1):10-18. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- lañez Pareja, E. (2006). *Recuento de colonias en placa*. Universidad Nacional del Nordeste. <https://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna, Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 89-98. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v11n2/a06v11n2.pdf>
- Agrometeorología. Red Agrometeorológica INIA (2025). Datos agrometeorológicos. <https://agrometeorologia.cl/tmp/agrometeorologia20250428141131.xlsx>
- Guzmán Duchén, D., & Montero Torres, J. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(2), 87-101. <http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v8n2/2409-1618-riiarn-8-02-87.pdf>
- Obando Castellanos, D. M., Burgos Zabala, L. B., Rivera Botía, D. M., Rubiano Garrido, M. F., Divan Baldani, V. L., & Bonilla Buitrago, R. R. (2010). Caracterización De Bacterias Diazotróficas Asimbióticas Asociadas Al Eucalipto (*Eucalyptus Sp.*) En Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 107-120. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319027886008>
- Holt, J.G; Kreig, NR; Sneath, P.H; Staley, J.T, Williams, S.T 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Willimans and Wilkins.
- Latt, Z. K., Yu, S. S., Kyaw, E. P., Lynn, T. M., Nwe, M. T., Mon, W. W., & Aye, K. N. (2018). Using cellulolytic nitrogen fixing bacterium, *Azomonas agilis* for effective degradation of agricultural residues. *The Open Microbiology Journal*, 12(1), 154-162. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010154>

- Rikhma Sari, D. N., & Amorim, D. . (2025). A Comparative Study on the Effectiveness of *Azotobacter chroococcum* and *Beijerinckia indica* as Biofertilizers for Enhancing the Growth of *Alternanthera ficoidea*. *Journal of Biotropical Research and Nature Technology*, 3(2), 94–102. <https://doi.org/10.52850/borneo.v3i2.19878>
- Bhandari, S., Bhattarai, B. R., Adhikari, A., Aryal, B., Shrestha, A., Aryal, N., Lamichhane, U., Thapa, R., Thapa, B. B., Yadav, R. P., Khadayat, K., Adhikari, A., Regmi, B. P., & Parajuli, N. (2022). Characterization of *Streptomyces* species and validation of antimicrobial activity of their metabolites through molecular docking. *Processes*, 10(10), 2149. <https://doi.org/10.3390/pr10102149>
- Uzcátegui-Negrón, M., Serrano, J. A., Boiron, P., Rodríguez-Nava, V., Couble, A., Monié, D., Sánchez Herrera, K., Sandoval, H., Reviakina, V., Panizo, M. M., & Mendoza, M. (2009). Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 104–112. <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199414957005.pdf>
- Salazar Loaiza, A. M., & Ordóñez Guerrero, C. A. (2013). Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira [Trabajo de grado, Universidad Tecnológica de Pereira]. Repositorio Institucional UTP. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/0f63610e-b019-4b8c-abfa-7d3233b331f4/content>
- Gtari, M., Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I. et al. (2011) Perspectivas filogenéticas de las actinobacterias fijadoras de nitrógeno. *Arch Microbiol* 194, 3–11 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0733-6>
- Latt, Z. K., Yu, S. S., Kyaw, E. P., Lynn, T. M., Nwe, M. T., Mon, W. W., & Aye, K. N. (2018). Using cellulolytic nitrogen fixing bacterium, *Azomonas agilis* for effective degradation of agricultural residues. *The Open Microbiology Journal*, 12, 154–162. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010154>

- Becking, J.H. (1992). La familia Azotobacteraceae. En: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, KH. (Eds) Los procariotas. Springer, Nueva York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_3
- Viscardi, S, Ventrino, V, Duran, P, Maggio, A, De Pascale, S, Mora, M.L, & Pepe, O. (2016). Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of Azotobacter chroococcum strains for a potential use in sustainable agriculture. Journal of soil science and plant nutrition, 16(3), 848-863. Epub 00 de julio de 2016. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000060>

9. ANEXOS

Tabla A1. Caracterización macroscópica de bacterias diazótrofes asimbióticas respecto a su forma, elevación y margen.

Forma	 Circular	 Irregular	 Lentijuela	 Filamentosa	 Rizoide
Elevación	 Plana	 Convexa	 Umbonada		
Margen	 Entero	 Ondulado	 Lobado	 Filamentoso	 Rizado

Fuente: obtenida de Garzón, 2013.

Parámetros complementarios en labores de análisis de muestreo.

Tabla B1. Parámetros climáticos complementarios para el análisis de los días de muestreo en cultivo de alfalfa y maíz.

Tiempo UTC-4	Temperatura del Aire (°C)	Humedad Relativa %	Precipitación Acumulada (mm)	Radiación Solar (Mj/m ²)
03-09-2024	7,5	82,4	0	45,9
29-10-2024	17,6	75,7	0	49,6
03-12-2024	14,2	67,3	0	48,8
28-01-2025	19,9	53,7	0	46,8

Fuente: Elaboración propia a partir de información de Red agrometeorológica INIA.

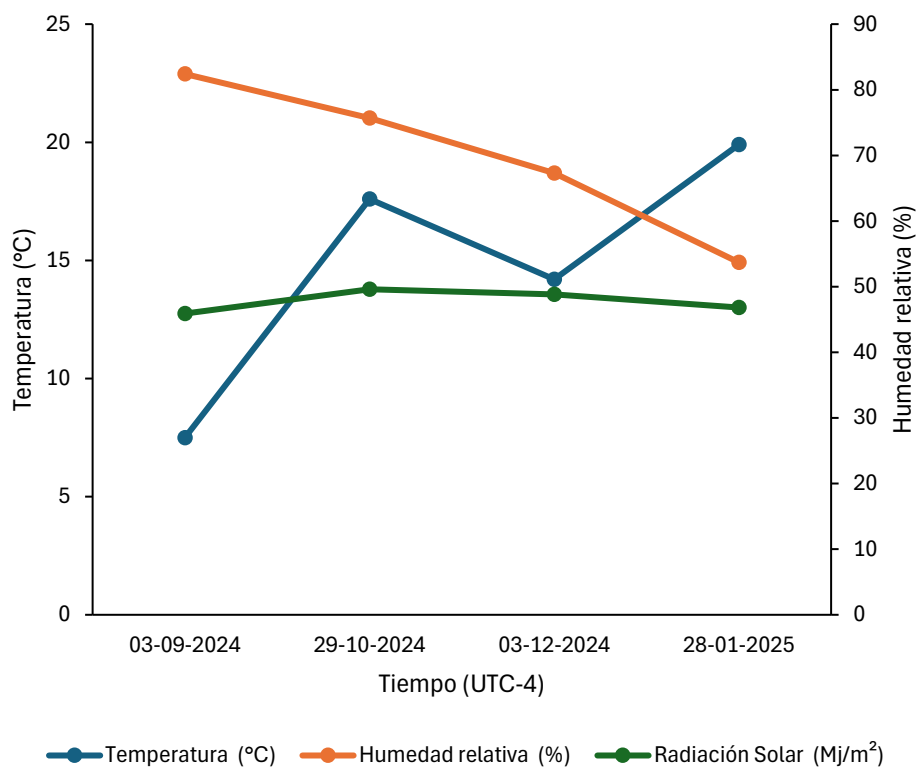


Figura B1. Parámetros climáticos de Temperatura (°C) vs Humedad relativa (%) vs Radiación (Mj/m²) en Chillán los días de muestreo de los cultivos de alfalfa y maíz ubicados en la facultad de ingeniería agrícola.

Fuente: Elaboración propia a partir de información de Red agrometeorológica INIA.

Tabla B2. Complemento conteo UFC primer muestreo para cultivo de alfalfa con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra AP1	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
10-09-2024	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	149	7500000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	151	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	35	19250000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	42	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	19	100000000
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	21	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla B3. Complemento conteo UFC primer muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra MP1	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
10-09-2024	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	61	6000000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	179	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	180	47500000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	10	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	69	212500000
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	16	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla B4. Complemento conteo UFC segundo muestreo para cultivo de alfalfa con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra AP2	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
04-11-2024	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	24	1600000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	40	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	8	5000000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	12	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	2	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	2	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla B5. Complemento conteo UFC segundo muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra MP2	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
04-11-2024	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	35	1875000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	40	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	13	6000000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	11	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	6	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	7	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla B6. Complemento conteo UFC tercer muestreo para cultivo de alfalfa con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra AP3	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
17-12-2024	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	51	1875000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	24	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	3	2250000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	6	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	2	12500000
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	3	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla B7. Complemento conteo UFC tercer muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra MP3	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
17-12-2024	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	38	2125000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	47	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	13	6000000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	11	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	3	15000000
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	3	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla B8. Complemento conteo UFC cuarto muestreo para cultivo de alfalfa con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra AP4	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
28-01-2025	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	15	850000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	19	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	7	3500000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	7	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	3	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	2	

Fuente: Elaboración propia

Tabla B9. Complemento conteo UFC cuarto muestreo para cultivo de maíz con todas las diluciones trabajadas.

Fecha	Muestra MP4	Serie	Volumen muestra (ml)	Factor Dilución (FDD)	N°Colonias	UFC/g suelo
28-01-2025	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	25	1100000
	suelo	10 ⁻⁴	0,2	10000	19	
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	9	4750000
	suelo	10 ⁻⁵	0,2	100000	10	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	5	
	suelo	10 ⁻⁶	0,2	1000000	1	

Fuente: Elaboración propia.