



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



Componente práctico del Examen de Grado de carácter Complexivo,  
presentado al H. Consejo Directivo de la Facultad, como requisito previo  
para obtener el título de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**TEMA:**

“Importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la  
agricultura”.

**AUTORA:**

Cindy Natsalene Filian Berruz

**TUTORA:**

Ing. Agr. Oscar Mora Castro, MAE.

**BABAHOYO - LOS RÍOS - ECUADOR**

**2021**

## **DEDICATORIA**

Se la dedico principalmente a Dios, mi padre celestial, a mis Padres por haberme formado, con valores y principios y convertirme como la persona que soy en la actualidad, por enseñarme a ser perseverante y no decaer guiándome al camino de la superación.

A mi hijo, esposo, hermanas y mi Tia Edith Filian, quienes me han brindado su ayuda de todo corazón y complementan mi felicidad para concretar con éxito la finalización de mis estudios.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi gratitud a Dios por bendecir mi vida y la de mi familia, por ser la fortaleza en momentos de dificultad y debilidad.

Gracias a mis padres Sr. Gino Filian y Sra. Sandra Berruz, por ser mis pilares fundamentales en esta meta, por confiar y creer en mi capacidad estudiantil, por cada uno de sus consejos y valores que siempre estuvieron inculcándome.

Agradezco a toda la Facultad de Ciencias Agropecuarias, a cada uno de mis maestros quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que crezca cada día como profesional, gracias al Ing. Oscar Mora, mi tutor, por su paciencia, dedicación y apoyo incondicional en este trabajo investigativo.

Finalmente quiero agradecer a mis amigas, por el apoyo mutuo que tuvimos, por extender su mano en momentos difíciles, las llevo en mi corazón.

## RESUMEN

### “Importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura”.

El presente trabajo se basa en la importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura, ya que existen varias investigaciones centradas en este tipo de bacterias (*Azospirillum spp.*, *Azotobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Rhizobium spp.*, *Nitrosomonas spp.*, *Nitrobacter spp.*, *Pantoea spp.*, *Agrobacterium spp.*). Existen varios géneros de bacterias Gram negativas presentes en el suelo, las cuales proporcionan un sinnúmero de beneficios a los cultivos: promotoras de crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno atmosférico, conversión de nutrientes no asimilables a asimilables, control de enfermedades. Algunas se encuentran en forma libre y otras asociadas con las plantas. Varias labores culturales realizadas por los agricultores están reduciendo las poblaciones de bacterias Gram negativas benéficas. Algunas bacterias Gram negativas benéficas presentes en el suelo, pueden ser aisladas en laboratorio para aumentar sus poblaciones y luego ser inoculadas a los cultivos; o para la elaboración de biofertilizantes. La mayoría de los agricultores desconocen los beneficios de las bacterias Gram negativas en la agricultura, razón por la cual continúan realizando labores culturales que están disminuyendo sus poblaciones.

**Palabras clave:** bacterias, Gram negativas, benéficas, agricultura.

## SUMMARY

### “Importance of beneficial Gram negative bacteria in agriculture”

The present work is based on the importance of beneficial Gram negative bacteria in agriculture, since there are several investigations focused on this type of bacteria (*Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Nitrosomonas* spp., *Nitrobacter* spp., *Pantoea* spp., *Agrobacterium* spp.). There are several genera of Gram negative bacteria present in the soil, which provide countless benefits to crops: plant growth promoters, fixation of atmospheric nitrogen, conversion of non-assimilable to assimilable nutrients, disease control. Some are found in free form and others associated with plants. Various cultural tasks carried out by farmers are reducing the populations of beneficial Gram negative bacteria. Some beneficial Gram negative bacteria present in the soil can be isolated in the laboratory to increase their populations and then be inoculated to the cultures; or for the production of biofertilizers. Most farmers are unaware of the benefits of Gram negative bacteria in agriculture, which is why they continue to carry out cultural tasks that are decreasing their populations.

**Keywords:** bacteria, Gram negative, beneficial, agriculture.

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
RESUMEN .....	III
SUMMARY.....	IV
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPITULO I. MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>3</b>
1.1. Definición del tema caso de estudio.....	3
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Justificación.....	3
1.4. Objetivos .....	4
1.4.1. Objetivo general .....	4
1.4.2. Objetivos específicos.....	4
1.5. Fundamentación teórica.....	5
1.5.1. Clasificación de las bacterias según Gram.....	5
1.5.2. Bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura.....	5
1.6. Hipótesis.....	14
1.7. Metodología de la investigación.....	14
<b>CAPÍTULO II. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>15</b>
2.1. Desarrollo del caso.....	15
2.2. Situaciones detectadas.....	15
2.3. Soluciones planteadas.....	15
2.4. Conclusiones.....	16
2.5. Recomendaciones.....	16
BIBLIOGRAFÍA.....	17

## INTRODUCCIÓN

El advenimiento de las tinciones a mediados del siglo XIX, fue en gran parte, responsable de los principales avances que tuvieron lugar en la Microbiología y en otros campos del diagnóstico microscópico durante los últimos 100 años. Desde los inicios de la Microbiología la tinción de Gram se ha convertido en una de las tinciones diferenciales más usadas, como herramienta básica para el diagnóstico preliminar y presuntivo de agentes bacterianos. Esta coloración diferencial clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, con base a las diferencias estructurales de sus paredes celulares (Morales 2013).

El mismo autor señala que las bacterias Gram negativas tienen espacios en la estructura de su pared celular y el alcohol acetona es un solvente de lípidos que actúa sobre la membrana exterior de la pared celular afectando la membrana citoplasmática donde se unen las moléculas que componen el peptidoglicano. De igual manera, la delgada capa de peptidoglicano no es capaz de retener el complejo cristal violeta-yodo, lo cual obliga a las células Gram negativas a decolorarse, necesitando entonces la adición de la safranina o la fuscina como colorante de contraste para colorearse de rosado.

Actualmente existen varias investigaciones focalizadas en la evaluación de la diversidad genética y bioquímica de los microorganismos rizosféricos, su caracterización en relación a la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos, aporte de nutrientes, producción de hormonas vegetales y de sustancias capaces de captar hierro (sideróforos). También se incluye la selección de los microorganismos más eficientes en experimentos de inoculación en condiciones ambientales controladas de laboratorio, invernadero y de campo, al igual que el estudio de los costos de producción con la aplicación de microorganismos vs. fertilizantes químicos en cultivos de interés agrícola (Pedraza et al. 2010).

Una de las alternativas al problema de la fertilización es el uso de bacterias rizosféricas con propiedades de promoción de crecimiento vegetal. Estas bacterias usan mecanismos como fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de índoles y sideróforos, para favorecer la toma de nutrientes y así promover el

crecimiento vegetal. En la rizósfera están presentes diferentes géneros bacterianos entre los que se destacan *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, *Rhizobium*, entre otros. Los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* son ampliamente utilizados por sus características como fijadores de nitrógeno, la capacidad de producir índoles y solubilizar fósforo (Pérez y Sánchez 2017).

Además del grupo de bacterias mencionadas anteriormente, existen otras encargadas de realizar un proceso conocido como nitrificación, que es la segunda fase del ciclo del nitrógeno (la primera fase es la fijación). La nitrificación es llevada a cabo secuencialmente por un primer grupo específico de bacterias autótrofas (*Nitrosomonas*) que convierte el amonio en nitrito (nitritación), el que inmediatamente es atacado por un segundo grupo de bacterias autótrofas (*Nitrobacter*) para convertir el nitrito en nitrato (nitratación). Las bacterias nitrificantes se encuentran en casi todos los suelos, pero son muy sensibles a condiciones ambientales extremas (Benimeli et al. 2019).

Por lo mencionado, se justifica la elaboración del presente documento, en el cual se describirán los principales géneros de bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura, así como su importancia.



## **CAPITULO I. MARCO METODOLÓGICO**

### **1.1. Definición del tema caso de estudio.**

El presente trabajo práctico de modalidad del Examen Complexivo previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma es el siguiente:

“Importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura”.

### **1.2. Planteamiento del problema.**

El problema radica en que existe un total desconocimiento por parte de los agricultores sobre las bacterias benéficas Gram negativas que habitan en los suelos, las cuales cumplen diferentes funciones para el desarrollo de los cultivos (promotoras del crecimiento vegetal, fijadoras de N atmosférico, solubilizadoras de P, entre otras), ya sea que se encuentren de forma libre o en asociación con las plantas. Esto ha llevado a la realización de prácticas agrícolas que disminuyen la población de estos microorganismos benéficos, como, por ejemplo: el monocultivo, la quema de los restos de la cosecha anterior, el uso indiscriminado de insumos agrícolas, etc.

Debido a este desconocimiento, los agricultores no se han preocupado por realizar un análisis microbiológico de suelos, el cual les mostraría el tipo de bacterias Gram negativas benéficas que habitan en la rizósfera. Con este conocimiento, se podría aprovechar las propiedades benéficas de las mismas, con lo cual se podría reducir la aplicación de fertilizantes edáficos, y más bien iniciar con la aplicación de productos que ayuden al aumento de las poblaciones de dichas bacterias.

### **1.3. Justificación.**

La agricultura moderna enfrenta nuevos desafíos, integrando enfoques ecológicos y moleculares, para lograr mayores rendimientos de los cultivos y reducir al mínimo los impactos sobre el ambiente. Para generar mayores rendimientos se han incrementado significativamente las dosis de fertilizantes sintéticos por unidad

de superficie, los cuales pueden provocar contaminación, daños a la salud y pérdida de la fertilidad de los suelos, convirtiéndose en una de las preocupaciones más importantes en la producción agrícola. Para mejorar la producción sin el uso de fertilizantes de origen sintético, las investigaciones se han interesado en los microorganismos benéficos, ya que éstos pueden promover el crecimiento de las plantas y, en algunos casos, evitar infecciones del tejido vegetal por patógenos. Existen varias investigaciones de este tipo, centradas en las bacterias gram negativas benéficas (*Azospirillum spp.*, *Azotobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Rhizobium spp.*, *Nitrosomonas spp.*, *Nitrobacter spp.*, *Pantoea spp.*, *Agrobacterium spp.*) (Moreno et al. 2018).

Los estudios basados en la diversidad microbiana se han enfocado a microorganismos cercanos a las raíces de las plantas (rizósfera), superficie de raíces y hojas (rizoplano y filósfera) y en el interior de los tejidos de las plantas (endósfera). Estas establecen asociaciones con diferentes comunidades microbianas, donde algunos de los miembros contribuyen positivamente al crecimiento, desarrollo y productividad de ésta. Esto ha generado una demanda por encontrar genes, enzimas y compuestos que sean provistos de nichos microbianos de las plantas. Por ende, es muy importante conocer la distribución y abundancia de las bacterias Gram negativas en las plantas (Perez 2017).

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

- Conocer la importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Describir los géneros de bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura.
- Determinar la importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura.

## **1.5. Fundamentación teórica.**

### **1.5.1. Clasificación de las bacterias según Gram.**

En la década de 1880, en un hospital de Alemania (Berlín) trabajó el médico danés Hans Christian Gram, el cual desarrolló la más importante tinción bacteriológica. Él implementó una técnica de tinción mediante la cual pudo observar bacterias en tejidos de pulmones de pacientes que morían de neumonía. El procedimiento que desarrolló, ahora llamado tinción de Gram, demostró dos categorías generales de bacterias: algunas se teñían de violeta y otras se teñían de rojo. Las bacterias teñidas de azul fueron conocidas como Gram positivas, y las teñidas de rojo como Gram negativas.

En 1963 M.R.J. Salton explicó el mecanismo de diferenciación de la técnica de Gram, la cual diferencia a las bacterias en dos grandes grupos: se llama bacterias Gram positivas a aquellas que retienen la tinción azul-violeta, y se denomina bacterias Gram negativas a las que se decoloran y después se tiñen con safranina. Esta diferencia de tinciones se debe a la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias. Actualmente la tinción de Gram sigue siendo un método eficaz e importante en el laboratorio, además de que es rápido y económico, por lo que se debe estandarizar para evitar errores técnicos o de interpretación (Rodríguez y Arenas 2018).

### **1.5.2. Bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura.**

#### **1.5.2.1. Género *Azospirillum*: características principales.**

Las bacterias pertenecientes a este género son organismos fijadores de N<sub>2</sub> que poseen una amplia distribución ecológica, ya que ha sido posible detectar su presencia en zonas templadas, tropicales y subtropicales. Se describen en la literatura como Gram negativas, aunque la gran variabilidad ha sido observada en varias cepas de *Azospirillum brasilense*. La morfología de las células depende de las condiciones nutricionales y edad del cultivo. Se observan formas eses y vibroides de 0,8 a 1 x 2 a 5 micrómetros de tamaño; se asocia además la aparición de formas quísticas o en C, como vía de resistencia a las condiciones de estrés y del mismo modo como mecanismo de supervivencia en la rizósfera. Contienen

gránulos de poli-βhidroxibutirato (PHB) como material de reserva y un sistema muy eficiente de adquisición de hierro a través de sideróforos, que le permite secuestrarlo en la rizosfera, haciéndolo no utilizable por otros microorganismos.

Las células son mótils tanto in vitro como en el suelo y son capaces de adaptar su flagelación a diferentes ambientes. Aunque pueden desarrollarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, son preferentemente microaerófilas en presencia o ausencia de fuentes combinadas de nitrógeno (Parra y Cuevas 2001).

Las bacterias del género *Azospirillum* se clasifican como Gram-negativas de vida libre, con formato de bastón y movimiento activo, y poseen de 0.8 a 2 μm de diámetro y de 2 a 4 μm de longitud. Según algunos autores, estas bacterias son estrictamente aerobias, cuando se les suministran fuentes nitrogenadas o microaerófilas cuando están en un ambiente libre de N<sub>2</sub>, es decir, cuando necesitan realizar FBN. Sin embargo, estos autores observaron que para promover un ambiente microaerófilo las bacterias en medio semisólido producen una película delgada en forma de velo, con concentración de oxígeno esencial para la fijación del nitrógeno y para iniciar su crecimiento.

El *Azospirillum* posee un metabolismo de carbono y nitrógeno flexible que aumenta su capacidad de competir por la colonización de la rizósfera, además de que se los denominan diazótrofos endófitos facultativos por colonizar tanto el interior como la superficie de las raíces. La colonización ocurre principalmente en la zona de elongación y la zona de los pelos radicales. Cuando están presentes en la rizósfera, estas colonizan tanto la capa de mucigel alrededor de las raíces (colonización externa) como los espacios intercelulares de las raíces (colonización interna) (Fernandes et al. 2020).

Los mismos autores manifiestan que es una bacteria que se desarrolla bien en temperatura óptima entre 28 y 41°C y es altamente competitiva mientras que coloniza la rizósfera, haciendo el uso de diferentes fuentes de nitrógeno como amoníaco, nitrito, nitrato, nitrógeno molecular y aminoácidos, y fuentes de carbono como ácidos orgánicos (malato, piruvato, succinato y fructosa), para el mantenimiento de su metabolismo. A la fecha se tienen identificadas en el mundo 15

especies de *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadiense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis* y *A. thiophilum*. Sin embargo, las especies más investigadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense*, las cuales son de ocurrencia más común en gramíneas y forrajeras de regiones tropicales.

#### **1.5.2.2. Importancia del Género *Azospirillum* en la agricultura.**

El principal mecanismo por el cual *Azospirillum* influye en el desarrollo y la productividad de las plantas es especulativo y aún motivo de debate. Algunas explicaciones incluyen: fijación de nitrógeno atmosférico, que contribuye al nitrógeno de la planta, efectos hormonales que alteran el crecimiento y metabolismo de la planta, incrementos del desarrollo, en general, del sistema radical que provoca un aumento en la toma de minerales y agua, actividad nitrato reductasa bacteriana en la raíz, que incrementa la acumulación de nitrato en plantas inoculadas y la teoría aditiva que plantea la sucesión de cada uno de estos mecanismos. (Parra y Cuevas 2001).

#### **1.5.2.3. Género *Azotobacter*: características principales.**

*Azotobacter* es un género que son de vida libre que se desarrollan de forma adecuada en medios sin N. Utilizan el N atmosférico para la síntesis de sus proteínas celulares. La proteína celular se mineraliza después de la muerte de la célula, y así, contribuye a la disponibilidad de N para las plantas silvestres y cultivadas. Son Gram negativas, poseen una pared celular compleja, formada por una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano, el cual posee ácido murámico y mureína. Las especies del género *Azotobacter* son células ovoides y grandes de 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, que viven en suelos y aguas frescas. Son bacterias pleomórficas, su morfología varía desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se las observa como células individuales, como pares, en agregados irregulares y algunas veces cadenas de tamaño variable (Egas 2010).

El mismo autor menciona que las principales especies son *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. beijerinckii*. Las dos primeras sufren un proceso de diferenciación

para formar quistes resistentes a la desecación. Se mueven por medio de flagelos peritricos; son aerobios, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Son bacterias quimioorganotróficas, es decir, que utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de N. Responden de manera positiva al reactivo catalasa.

#### **1.5.2.4. Importancia del Género *Azotobacter* en la agricultura.**

Las bacterias del género *Azotobacter* son fijadoras de N de vida libre, solubilizadoras de P y productoras de sustancias promotoras de crecimiento. Los efectos benéficos en la productividad y rendimiento de diferentes cultivos por la inoculación con *Azotobacter* han sido demostrados por distintos autores, confirmando con ello que las aplicaciones de estas bacterias favorecen la interacción suelo – microorganismo – planta. Estas bacterias son diazótrofos conocidos por su elevada tasa de respiración. Aun así, pueden llegar a fijar de 10 a 20 kg de N/ha asimbióticamente empleando un mecanismo de protección respiratoria

Dentro de las capacidades metabólicas y genéticas de este género se encuentran también la producción de polímeros de uso industrial tales como alginato y el polihidroxibutirato. Estos polisacáridos extra celulares (EPS) protegen a las células contra la desecación, protozoarios o ataque de fagos, y a la nitrogenasa contra altas concentraciones del oxígeno ambiental, así como de la penetración de iones metálicos tóxicos al interior de la célula. (Flores y Rodríguez 2014).

#### **1.5.2.5. Género *Pseudomonas*: características principales.**

Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan gran capacidad para utilizar diversidad de nutrientes, razón por la que se explica su ubicuidad. Su actividad enzimática las convierte en un grupo de microorganismos importante, debido a que son responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en diversos ecosistemas. Estas bacterias son bacilos Gram-negativo, rectos o ligeramente curvados y saprofitas. Se pueden encontrar en ecosistemas acuáticos y en el suelo. No forman esporas y el rango de temperatura más favorable para su

desarrollo es de 25 a 30°C, aunque puede crecer desde 5 a 42°C (Pérez et al. 2015).

El mismo autor manifiesta que estas bacterias abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, interactuando de forma asociativa con la planta.

#### **1.5.2.6. Importancia del Género *Pseudomonas* en la agricultura.**

Una forma de movilizar el P insoluble del suelo es a través de microorganismos que poseen la capacidad de solubilizar el P, mediante la producción de ácidos y fosfatasas ácidas y alcalinas. *Pseudomonas sp.*, son rizobacterias con capacidad para fomentar el crecimiento de las plantas mediante sus diversos mecanismos como la solubilización de P, la producción de hormonas y sideróforos. Sin embargo, aunque estas bacterias se encuentren en el suelo, su número no es suficiente para competir con la gran variedad de bacterias que se encuentran ya establecidas en las rizósferas de los cultivos, por lo cual, para obtener una alta solubilización de P, es necesario inocularlas (Pincay 2014).

La efectividad de cepas de *Pseudomonas* con actividad antagonista, frente a fitopatógenos que afectan a cultivos de importancia económica, ha sido informada por varios autores. Este género bacteriano constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos a través de los cuales ejerce un efectivo control biológico, incluyendo el antagonismo directo y la inducción de resistencia en la planta. Sin embargo, *Pseudomonas* no tiene la capacidad de producir esporas de resistencia, lo que limita su formulación para uso comercial. *P. fluorescens* es una de las especies más estudiadas, pues produce metabolitos como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas. Se informó su efectividad en el control de hongos patógenos como *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx & H. Olivier var. tritici, *Aspergillus sp.*, *Pyricularia oryzae* Cav., entre otros (Pérez et al. 2015).

Los mismos autores señalan que *P. fluorescens* tiene una gran capacidad para solubilizar P. La bacteria puede realizar esta actividad a través de dos vías: la primera es la producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, glucónico) que actúan sobre el pH del suelo, favoreciendo la solubilización del P inorgánico y liberando el

fosfato al suelo. La otra vía es a través de las fosfatasas, estas son enzimas hidrolasas (monoesterasas y diesterasas fosfóricas) que actúan sobre las uniones ésteres, liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica. Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfato, disponible para ser absorbido por las raíces de las plantas.

#### **1.5.2.7. Género *Rhizobium*: características principales.**

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno. Es marcado el interés que estas bacterias representan para la agricultura, que se emplean como inoculantes (biofertilizantes). (Cuadrado et al. 2009).

Son bacilos que miden 0.5-1.0x1.2-3.0  $\mu\text{m}$ . Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en YMA (agar extracto de levadura-manitol). Hay nueve especies definidas: *R. leguminosarum* (especie tipo), *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. mongolense* y *R. tropici*. Nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales. Estas especies forman un grupo polifilético en el árbol filogenético. *R. giardinii* es una rama distantemente relacionada con las otras especies. *R. galegae* y *R. huautlense* tienen una relación más cercana con las especies de *Agrobacterium* que con las otras especies de *Rhizobium* (Wang et al. s.f.).

Las bacterias *Rhizobium* comúnmente conocidas como “Rizobios” no solamente se encuentran en la rizósfera (zona de raíces de las leguminosas) sino también como habitantes naturales del suelo, representando del 0.1 al 8 % del total de las bacterias en el mismo y hasta un 0,14 % de su biomasa; además estas bacterias de la raíz de las leguminosas son heterótrofas y capaces de utilizar una



amplia variedad de hidratos de carbono. Poseen a menudo gránulos de poli-beta-hidroxi-butirato. Generalmente *Rhizobium* vive saprofiticamente en el suelo, utilizando fuentes de energía y sustancias nitrogenadas del medio. En laboratorio se obtiene un crecimiento óptimo de los mismos entre 25-30 °C, buena aireación y con un pH del medio del cultivo entre 6 y 7 (Casa 2014).

#### **1.5.2.8. Importancia del Género *Rhizobium* en la agricultura.**

Uno de los principales elementos en la agricultura sustentable es el manejo efectivo del nitrógeno (N) en el medioambiente. Para obtener un buen rendimiento en los cultivos agrícolas es necesario utilizar fertilizantes químicos nitrogenados, los cuales elevan los costos de producción, lo que afecta la economía del productor y del consumidor. Una de las alternativas para resolver este problema de manera ecológica es la utilización de inoculantes elaborados con bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el suelo e inductoras de nódulos, comúnmente conocidas como rizobios. Estas bacterias, al establecer una relación simbiótica con las leguminosas, tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en nitrógeno orgánico, el cual puede ser utilizado por la planta, e incorporarlo en sus procesos metabólicos posteriores (Cantaro et al. 2019).

Para la agricultura la relación simbiótica más importante envuelve a las bacterias denominadas rizobios con plantas leguminosas. Dicha asociación, aumenta la transferencia de N fijado a la planta a partir de los rizobios residentes en su interior, los cuales están presentes en una estructura denominada nódulo, en las raíces de la planta. La planta de forma recíproca provee protección y sule de compuestos ricos energéticamente a la bacteria. Los nódulos también proveen un ambiente con bajo contenido de oxígeno, lo cual es vital ya que la nitrogenasa, enzima que cataliza la FBN, es desnaturalada por el oxígeno. Sin embargo, algunas cantidades de oxígeno deben ser provistas a la bacteria para que esta pueda respirar y producir la energía requerida tanto para su supervivencia como para conducir la FBN. Una proteína especial transportadora de oxígeno denominada leghemoglobina, regula la cantidad de oxígeno que llega a la bacteria (Rojas 2009).

#### **1.5.2.9. Género *Nitrosomonas*: características principales.**

Una de las fases del N es la Nitrificación, la cual involucra a un primer grupo de bacterias quimiolitotórficas, conocidas como bacterias amonio-oxidantes por sus siglas en inglés como “AOB” (amonió-oxidizing bacteria), estas bacterias son grupos de procariontes con la capacidad de oxidar el amoníaco. Se caracterizan por la morfología y sus membranas celulares Gram negativas, y pueden ser móviles por medio de flagelos. Las *Nitrosomonas* son bacilos cortos o largos, móviles o inmóviles, que se encuentran en el suelo, aguas residuales, aguas dulces o aguas marinas. Poseen un tamaño celular de 0,7 -1,5 x 1,0 – 2,4  $\mu\text{m}$  (Abzazou 2016).

#### **1.5.2.10. Importancia del Género *Nitrosomonas* en la agricultura.**

En las últimas décadas, el número de ambientes ricos en amonio ha aumentado drásticamente debido a las actividades humanas; por lo tanto, la nitrificación se ha convertido en un proceso que afecta el ciclo global del nitrógeno. En este proceso, las *Nitrosomonas* (pertenecientes a las AOB) son un componente esencial, responsable de la oxidación del amoníaco a nitrito, con hidroxilamina como producto intermedio. Estas bacterias pueden degradar numerosos compuestos orgánicos, y se considera que participan en la primera etapa de nitrificación. Debido a su crecimiento extremadamente lento, las AOB se encuentran, por lo general, en pequeñas cantidades en ambientes naturales, lo que hace que sean difíciles de detectar por los métodos de cultivo microbiológico tradicional. En las últimas décadas, se han desarrollado herramientas moleculares independientes de cultivo basado en la caracterización del 16S ARNr para identificar bacterias oxidantes de amoníaco (como las *Nitrosomonas*), y existen varios reportes sobre la diversidad de las AOB a partir de hábitats terrestres y marinos. Las AOB son quimiolitótrofas obligadas, que obtienen energía y poder reductor de la oxidación del amoníaco a partir de la conversión de amoníaco a hidroxilamina. Dicha etapa está catalizada por la enzima amoníaco monooxigenasa (AMO), que es exclusiva del grupo de microorganismos integrados en las bacterias oxidantes del amoníaco (Andrade et al. 2015).

De todas las especies nitrificantes, uno de los géneros más estudiados son las *Nitrosomonas*, ya que son las que comúnmente han sido encontradas. La oxidación del amoníaco, considerada la primera fase de la nitrificación, y que es realizada por las *Nitrosomonas*,

En esta reacción hay desprendimiento de energía, la cual es utilizada por las *Nitrosomonas* para su crecimiento y mantenimiento celular. A este proceso de oxidación del amoníaco se lo conoce como Nitrificación, cuyo producto final es el Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Este es un proceso trascendental para la agricultura, pues en la segunda etapa de la nitrificación, el  $\text{NO}_2^-$  (nitrito) es transformado en  $\text{NO}_3^-$  (nitrato), forma en que las plantas toman el N (Jarpa 2016).

#### **1.5.2.11. Género *Nitrobacter*: características principales.**

Las bacterias *Nitrobacter* poseen forma de pera o también se presenta como bacilos cortos, móviles, inmóviles, Gram negativos, que habitan en el suelo, aguas dulces o aguas marinas, y poseen la enzima nitrito-oxido-reductasa (NXR). Tienen un tamaño celular de  $0,5 - 0,8 \times 1,0 - 2,0 \mu\text{m}$ . *Nitrobacter* es capaz de utilizar fuentes de energía a partir de la materia orgánica como parte de su metabolismo autótrofo facultativo y anaeróbico. Este género obtiene su energía para el crecimiento a partir de la oxidación de nitrito a nitrato, siendo clave en este proceso la enzima nitrito-oxido-reductasa. Entre las especies más conocidas se encuentran *N. winogradskyi*, *N. hamburgensis*, *N. vulgaris*, *N. alkalicus* (Abzazou 2016).

#### **1.5.2.12. Importancia del Género *Nitrobacter* en la agricultura.**

En la segunda etapa de la nitrificación se produce la oxidación de nitrito a nitrato por la acción de las *Nitrobacter*, denominándose Nitratación. Al igual que en la Nitrificación, también hay desprendimiento de energía, la misma que es usada por las bacterias para su desarrollo y mantenimiento celular. Esta fase es considerada una de las más importantes para la agricultura, ya que el resultado final es el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), forma en la cual las plantas toman el N para su normal crecimiento (Jarpa 2016).

Este proceso denominado nitrificación es realizado en forma secuencial: primero por un grupo específico de bacterias autótrofas (*Nitrosomonas*) que convierte el amonio en nitrito (nitrificación), el cual es inmediatamente atacado por un segundo grupo de bacterias autótrofas (*Nitrobacter*) para convertir el nitrito en nitrato (nitratación), forma en que las plantas toman el N (Benimeli et al. 2019).

## **1.6. Hipótesis.**

**H0:** El uso de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura no representa importancia.

**H1:** El uso de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura si representa importancia.

## **1.7. Metodología de la investigación.**

Consistió en la investigación bibliográfica de diferentes bases teóricas y científicas manifestadas por varios autores (páginas web, material publicado, e-books, enciclopedias, periódicos, tesis, tesinas, papers, review, artículos y revistas) en referencia al tema de estudio, lo que permitió fundamentar los objetivos planteados.

## **CAPÍTULO II. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.1. Desarrollo del caso.**

El presente trabajo correspondió al componente práctico del examen de grado de carácter complejo, previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma, realizado mediante la investigación bibliográfica en diferentes sitios web, en base al tema de estudio “Importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura”.

### **2.2. Situaciones detectadas.**

Existen varios géneros de bacterias Gram negativas presentes en el suelo, las cuales proporcionan un sinnúmero de beneficios a los cultivos; algunas se encuentran en forma libre y otras asociadas con las plantas.

Varias labores culturales realizadas por los agricultores están reduciendo las poblaciones de bacterias Gram negativas benéficas.

Algunas bacterias Gram negativas benéficas presentes en el suelo, pueden ser aisladas en laboratorio para aumentar sus poblaciones y luego ser inoculadas a los cultivos; o para la elaboración de biofertilizantes.

### **2.3. Soluciones planteadas.**

Se debe dar a conocer a los agricultores la gran cantidad de bacterias Gram negativas benéficas que habitan en los suelos.

Los agricultores deben empezar a practicar labores de conservación de suelos, pues la agricultura concencional está disminuyendo drásticamente las poblaciones de bacterias Gram negativas benéficas.

#### **2.4. Conclusiones.**

La mayoría de los agricultores desconocen los beneficios de las bacterias Gram negativas en la agricultura, razón por la cual continúan realizando labores culturales que están disminuyendo sus poblaciones.

Las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura cumplen varias funciones: promotoras de crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno atmosférico, conversión de nutrientes no asimilables a asimilables, control de enfermedades.

Es posible elaborar biofertilizantes a base de bacterias Gram negativas benéficas.

#### **2.5. Recomendaciones.**

De acuerdo a lo investigado en el presente trabajo podemos recomendar lo siguiente:

Capacitar a los agricultores en cuanto a los beneficios de los diferentes géneros de bacterias Gram negativas presentes en el suelo.

Realizar análisis microbiológicos de suelos para determinar los diferentes géneros de bacterias Gram negativas benéficas, así como sus poblaciones.

Utilizar biofertilizantes a base de bacterias Gram negativas ya que estas ayudan a fijar nitrógeno atmosférico en las plantas y son promotoras del crecimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

Abzazou, T. 2016. Técnicas moleculares para la caracterización microbiológica de los procesos de eliminación de nutrientes en las EDARs (en línea). Barcelona - España, Universidad de Barcelona. . Consultado 20 abr. 2021. Disponible en [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/402738/TARIK%20ABZAZOU\\_TESIS.pdf?sequence=1](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/402738/TARIK%20ABZAZOU_TESIS.pdf?sequence=1).

Andrade, S; Erosa De la Vega, G; Nevárez, G. 2015. Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana* 33(3):13.

Benimeli, M; Plasencia, A; Corbella, R; Andina, D; Sanzano, A; Sosa, F; Fernández de Ullivari, J. 2019. EL NITRÓGENO DEL SUELO. s.l., Universidad Nacional de Tucumán. Consultado 20 abr. 2021.

Cantaro, H; Huaranga, A; Zúñiga, D. 2019. Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia (Arica)* 37(4):73-81. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-34292019000400073>.

Casa, B. 2014. EVALUACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE CEPAS DE *Rhizobium* spp. EN INVERNADERO, PARA ARVEJA (*Pisum sativum*), CHOCHO (*Lupinus mutabilis*), FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*), HABA (*Vicia faba*) Y VICIA (*Vicia* sp.), CUTUGLAGUA-PICHINCHA. (en línea). Quito - Ecuador,

Universidad Central del Ecuador. . Consultado 20 abr. 2021. Disponible en <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2856/1/T-UCE-0004-92.pdf>.

Cuadrado, B; Rubio, G; Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista colombiana de ciencias químico farmacéuticas* 38(1):27.

Egas, J. 2010. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Azotobacter* sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), GENOTIPO NACIONAL, EN LA PROVINCIA DE ESMERALDAS (en línea). Quito - Ecuador, Escuela Politécnica Nacional. 106 p. Consultado 20 abr. 2021. Disponible en <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2307/1/CD-3051.pdf>.

Fernandes, C; Cecato, U; Trento, T; Mamédio, D; Galbeiro, S. 2020. *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 11(1):223-240. DOI: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>.

Ferrera, R; Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia ErgoSum* 8(2):10.

Flores, A; Rodríguez, R. 2014. *Azotobacter*: una bacteria con potencial como biofertilizante eco-amigable. Primera Edición. s.l., Plaza y Valdez Editores. 29 p. Consultado 20 abr. 2021.

Jarpa, M. 2016. Enriquecimiento de actividad nitrificante en sedimentos marinos mediante sistemas discontinuos (en línea). Concepción - Chile, Universidad de Concepción. 50 p. Consultado 20 abr. 2021. Disponible en <http://www.eula.cl/giba/wp-content/uploads/2017/09/tesis-mayra-jarpa-2016.pdf>.

Morales, G. 2013. La coloración de gram y su importancia en el diagnóstico microbiológico. (en línea, sitio web). Consultado 17 feb. 2021. Disponible en <https://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/coloracion-gram-diagnostico-microbiologico/>.



Moreno, A; García, V; Reyes, J; Vásquez, J; Cano, P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20(1):68-83. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>.

Parra, Y; Cuevas, F. 2001. POTENCIALIDADES DE *Azospirillum* COMO INOCULANTE PARA LA AGRICULTURA. *Cultivos Tropicales* 23(3):12.

Pedraza, R; Teixeira, K; Fernandez, A; García De Salamone, I; Baca, B; Azcón, R; Baldani, V; Bonilla, R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11(2):155. DOI: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol11\\_num2\\_art:206](https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206).

Perez, E. 2017. MICROPORPAGACIÓN Y BIOTIZACIÓN DE JOJOBA (*Simmondsia chinensis* L.) MEDIANTE BACTERIAS ENDÓFITAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL. (en línea). La Paz, Baja California Sur., Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 114 p. Consultado 17 abr. 2021. Disponible en <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/556>.

Pérez, J; Sánchez, D. 2017. Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea* Batatas del Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Biotecnología* 19(2):35-46. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69471>.

Pérez, S; Coto, O; Echemendía, M; Ávila, G. 2015. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Revista Protección Vegetal* 30(3):10.

Pincay, A. 2014. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS *Pseudomonas* sp. SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO, PRESENTES EN LA RIZÓSFERA DEL MAÍZ (*Zea mays* L) DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES DEL INIAP DE LAS PROVINCIAS DE IMBABURA, BOLÍVAR, CHIMBORAZO Y PICHINCHA (en línea). s.l., Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. 71 p. Consultado 20 abr. 2021. Disponible en <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/9785/1/AC-BIO-ESPE-048214.pdf>.

Rodríguez, P; Arenas, R. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* 16(2):2.

Rojas, D. 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. (en línea). Bogotá - Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 122 p. Consultado 20 abr. 2021. Disponible en <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8216/tesis212.pdf?sequence=1>.

Wang, E; Martínez, J; López, I. s.f. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas (en línea, sitio web). Consultado 20 abr. 2021. Disponible en <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>.