

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD METABÓLICA DE LA COMUNIDAD
MICROBIANA Y EL GRUPO FUNCIONAL DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES EN LA
RIZÓSFERA DE LA ESPECIE *Portulaca Oleracea* EN SUELOS DE USO AGRÍCOLA

YEISY DAYANA BARBOSA LÓPEZ

Universidad Católica de Manizales

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología

Manizales

2016

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD METABÓLICA DE LA COMUNIDAD
MICROBIANA Y EL GRUPO FUNCIONAL DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES EN LA
RIZÓSFERA DE LA ESPECIE *Portulaca oleracea* EN SUELOS DE USO AGRÍCOLA

YEISY DAYANA BARBOSA LÓPEZ

Trabajo de tesis para optar al título de bacterióloga

Director: Javier Guillermo Mantilla Afanador

Biólogo Ms(c)

Universidad Católica de Manizales

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología

Manizales

2016

Nota de aceptación:

Firma del presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Manizales, Junio del 2016

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que participaron en la culminación de este proyecto, en especial a mi director y guía Javier Guillermo Mantilla Afanador quien con su orientación, conocimiento, experiencia, paciencia y rigurosidad contribuyo a mi formación profesional. También le quiero agradecer por su confianza y por permitirme desarrollar habilidades y destrezas en otros campos de aplicación de mi carrera.

Agradezco profundamente a la Universidad Católica de Manizales por su valiosa colaboración facilitándonos las instalaciones y equipos requeridos para el desarrollo de este proyecto, y principalmente por su anhelo de formar profesionales integrales, con calidad humana y sentido de pertinencia. Deseo extender mis agradecimientos a la Dra. Gloria Inés Estrada por su preocupación y el ánimo infundido a lo largo de este proceso.

Por último, agradezco al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la tecnología COLCIENCIAS, por haber financiado este proyecto de investigación y al Grupo de Investigaciones Biológicas (GIBI) y al Semillero de Conservación de Hongos y Bacterias (COHOBAC) por la inspiradora labor de crear conocimiento y formar profesionales con pensamiento crítico.

Tabla de contenido

Resumen.....	9
1. Introducción.....	10
2. Marco teórico.....	12
3. Planteamiento del problema	17
4. Justificación.....	18
5. Objetivos.....	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos específicos.....	19
6. Metodología.....	20
6.1 Lugar de muestreo	20
6.2 Caracterización fisicoquímica de los suelos.....	20
6.3 Recolección y procesamiento de la muestra	21
6.4 Purificación y conservación de los aislamientos.....	22
6.5 Caracterización morfológica de los aislamientos de bacterias desnitrificantes	22
6.6 Pruebas bioquímicas e identificación presuntiva	22
6.7 Sistema Biology Ecoplate®	24
7. Resultados.....	25
7.1 Aislamiento de bacterias Desnitrificantes	25

7.2	Caracterización morfológica de los aislamientos de bacterias desnitrificantes	26
7.3	Pruebas bioquímicas e identificación presuntiva	27
7.4	Sistema Biology Ecoplate®	29
8.	Discusión	32
9.	Conclusiones.....	35
10.	Bibliografía.....	36

Lista de tablas

Tabla 1. Características suelo intervenido Vereda Alquería.....	20
Tabla 2. Aislamientos de bacterias desnitrificantes en Medio Complejo y Caldo Bouillon	25
Tabla 3. Caracterización morfológica de cinco aislamientos de la rizósfera de la especie <i>Portulaca oleracea</i>	26
Tabla 4. Caracterización bioquímica de los cinco aislamientos.	28
Tabla 5. Fuentes carbonadas utilizadas por la comunidad microbiana de <i>Portulaca oleracea</i> . ..	30
Tabla 6. Fuentes carbonadas utilizadas por el grupo funcional de Bacterias Desnitrificantes. ...	31

Lista de figuras

Figura 1. Aislamientos en Agar BHI. 25

Figura 2. Tinción de Gram..... 27

Resumen

Este proyecto presenta el aislamiento de bacterias desnitrificantes en la rizósfera de la planta *Portulaca oleracea* recolectada de un área dedicada al cultivo comercial de hortalizas en el Municipio de Villamaría Caldas, Vereda Alquería. La determinación del grupo funcional de bacterias desnitrificantes se realizó a través de estudios morfológicos, bioquímicos y metabólicos. El grupo de bacterias predominantes fue el de los Bacilos Grampositivos esporulados y Bacilos Gramnegativos, de los cuales se determinaron especies presuntivas de *Bacillus spp* y *Pseudomonas spp*.

Los aislamientos de las bacterias desnitrificantes se efectuaron en Medio Complejo, Caldo Bouillon, Agar BHI y Agar Glucosa Nitrato Medio. Se realizó caracterización macroscópica e identificación microscópica. El perfil bioquímico de los aislamientos se determinó en los medios Glucosa, Maltosa, Sacarosa, Lactosa, Rafinosa, Arabinosa, Sorbitol, Inositol, Manitol, MIO, TSI, LIA, Citrato, Urea, Gelatina, MRVP, Glucosa Nitrato, Almidón y Litmus Milk. Adicionalmente se realizó test de Oxidasa y Catalasa. El perfil metabólico del grupo funcional de las bacterias desnitrificantes y de la comunidad microbiana se desarrolló en el Sistema Biology Ecoplate®, en el cual la comunidad microbiana asociada a la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea* mostro mayor potencial metabólico para el aprovechamiento de sustratos en el suelo en contraste con el grupo funcional de bacterias desnitrificantes. Este estudio permitió conocer el estado de la diversidad metabólica del grupo funcional de bacterias desnitrificantes y de la comunidad microbiana asociada a la rizósfera en suelos de uso agrícola.

Palabras clave: Bacterias desnitrificantes; Bacilos Grampositivos esporulados; diversidad metabólica.

1. Introducción

En 1980 la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y el Fondo Mundial para la Vida Silvestre (WWF) ponen en marcha la Estrategia Mundial para la Conservación, la cual tiene como finalidad mantener los procesos ecológicos esenciales y los sistemas vitales, preservar la diversidad genética y asegurar el aprovechamiento sostenible de las especies y de los ecosistemas; en 1990 se desarrolla una nueva estrategia denominada Cuidar la Tierra la cual propicia a mejorar la situación del planeta y de la humanidad en materia de seguridad y de oportunidad (Cortes, 2004). A nivel mundial se está haciendo énfasis en la conservación de la biodiversidad creándose estrategias que permitan mitigar las causas principales del empobrecimiento biótico.

El aumento de la población ha hecho necesario crear actividades para mejorar la calidad de vida del ser humano, reduciendo de manera notoria los recursos de nuestro planeta. Estas actividades han tenido un impacto destructivo por falta de conciencia y de políticas que además de tener en cuenta factores económicos enfatizan en la sostenibilidad de los recursos, y en las ventajas o desventajas a corto y largo plazo de dichas actividades.

El eje Cafetero Colombiano es una zona rica en biodiversidad y es reconocida como prioritaria en los esfuerzos de conservación, a pesar de estos esfuerzos la biodiversidad se ha visto afectada por la deforestación, la fragmentación de los bosques y la conversión de tierras agrícolas y ganaderas, por vías y asentamientos humanos (Rodríguez, 2009).

El suelo es un ambiente natural provisto de elementos minerales, material orgánico, agua y aire (Rosa, 2008). En él se albergan gran diversidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y nematodos; los cuales varían según las condiciones edáficas y ecológicas del medio, los factores determinantes para su desarrollo son la presencia o ausencia de oxígeno, el contenido de humedad, la acidez del suelo y el contenido de materia orgánica (Cortes, 2004). Estos organismos tienen efectos directos en la fertilidad de las plantas, la disponibilidad de nutrientes y en el desarrollo de las raíces y el follaje (Macía, 2007).

Las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo comúnmente son utilizadas como indicadores de calidad, es necesario evaluar dicha calidad para mejorar o conservar la fertilidad y productividad del mismo; debido a que los microorganismos presentan una elevada sensibilidad a disturbios antropogénicos y su pérdida se encuentra relacionada a la baja productividad del suelo su estudio ha cobrado importancia para evaluar el impacto generado por las actividades agropecuarias (Vallejo, 2013)

Las bacterias desnitrificantes son filogenéticamente diversas y están distribuidas ampliamente en ecosistemas acuáticos y terrestres, son anaerobios facultativos es decir en ausencia de oxígeno utilizan el nitrato como aceptor final de electrones. Los géneros destacados son: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* (Joaquín, 2006).

Este estudio pretende conocer el perfil metabólico y encontrar las funciones de las bacterias desnitrificantes en los agroecosistemas o suelos de uso agrícola. Es relevante destacar que este proyecto es reconocido por COLCIENCIAS y pertenece a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica de Manizales vinculado al Grupo de Investigaciones Biológicas (GIBI) y el Semillero de Conservación de Hongos y Bacterias (COHOBAC).

2. Marco teórico

El suelo y el agua son los recursos naturales de mayor importancia en el mundo, de su uso racional depende la supervivencia de los ecosistemas, el abastecimiento de alimentos y de materias primas (Nuñez, 2001). El estudio del suelo permite identificar las áreas de riesgo e implementar estrategias para incrementar la productividad y preservar la diversidad genética.

El suelo es considerado un recurso natural no renovable debido a su vulnerabilidad y difícil recuperación (Silva, 2009), su calidad o evolución puede ser estudiada a través de parámetros físicos, químicos y microbiológicos; los parámetros físicos-químicos pueden verse alterados cuando el suelo sufre cambios severos, sin embargo se han evaluado parámetros como el pH y la estabilidad de los agregados (Medina, 2012). Los microorganismos del suelo son excelentes indicadores de calidad debido a que participa en la descomposición de residuos orgánicos, el ciclaje de nutrientes, la agregación de partículas, la síntesis de sustancias húmicas y la fijación de nitrógeno (Paz, 2006). El suelo es un ecosistema de enorme riqueza microbiana, las bacterias son los organismos más abundantes y metabólicamente activos, mientras que los hongos dado su mayor tamaño aunque menor abundancia tienen la biomasa más significativa (Olalde, 1998).

La estructura y estabilidad del suelo depende de la formación de agregados de arena, limo y arcilla; los agregados se mantienen unidos por los organismos de la rizósfera que contribuyen a la síntesis de nuevos compuestos a través de la descomposición de la materia orgánica y los exudados de las raíces (Mukerji, 2006).

La rizósfera es el entorno donde proliferan y compiten los microorganismos funcionales, algunos de ellos son benéficos para la planta porque le ayudan a transportar nutrientes, son promotores de crecimiento, fijan nitrógeno, y ayudan al control de patógenos (Anaya, 2001). Los

microorganismos de esta zona no están tan asociados a las raíces de las plantas como las micorrizas, sin embargo tienen un enorme efecto en el crecimiento de la planta (Ingraham, 1998). Se ha demostrado que la mayoría de los microorganismos que viven en la rizósfera pueden obtener nutrientes de las células de las raíces y de los compuestos exudados por las mismas (Casanova, 2005), estos compuestos (aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos, nucleótidos, flavonas, enzimas, ácido cianhídrico, glucósidos, auxinas y saponinas) tiene un efecto selectivo sobre los microorganismos cercanos a la raíz y proporcionar una base de alimento para los antagonistas que a su vez inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Mukerji, 2006).

Los primeros estudios de las rizobacterias se iniciaron hace más de un siglo con el descubrimiento de que las legumbres eran capaces de satisfacer sus necesidades de nitrógeno a través de la simbiosis con los rizobios *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y los *Methylobacterium nodulans*; desde entonces las investigaciones se han centrado en los procesos de la rizósfera y de la diversidad microbiana (Mukerji, 2006).

La materia orgánica es alimento y energía para los microorganismos benéficos presentes en el suelo, los cuales asimilan y metabolizan los nutrientes que no pueden ser utilizados por las plantas (Corpoica, 2007). En general el contenido de materia orgánica determina el poder nutritivo del suelo, un suelo pobre en materia orgánica puede producir durante algún tiempo pero pierde su productividad rápidamente. La acción más trascendental es el suministro de nitrógeno a las plantas, a través de los microorganismos que descomponen la materia orgánica. Al descomponer la materia orgánica la mayor parte de anhídrido carbónico escapa a la atmósfera, mientras que el suelo absorbe el amonio resultante de la desintegración de las sustancias proteicas, este proceso se denomina amonificación y los organismos responsables son especialmente las bacterias (Suarez, 1979).

Los microorganismos se encuentran en todos los tipos de suelos conservados y de uso agrícola. Los grupos predominantes son las bacterias, actinomicetos, hongos, nematodos y protozoos; la mayoría de estos organismos son heterótrofos es decir dependen de una fuente orgánica e inorgánica para su supervivencia y multiplicación (Mukerji, 2006). Los microorganismos muestran gran variedad cuantitativa y cualitativamente en diferentes sitios y a diferentes profundidades (Mukerji, 2006). Las bacterias desempeñan un papel trascendental en la naturaleza pues intervienen en los ciclos del carbono, nitrógeno, azufre, fosforo, hierro, entre otros (Des Abbayes, 1989). Las condiciones del suelo que favorecen el desarrollo bacteriano son temperaturas de 25 a 35°C, pH neutro o ligeramente alcalino (6,2 a 6,8), con riqueza en minerales, suficiente humedad, y materia orgánica (Arias, 2001). Gran parte de los suelos colombianos son reconocidos por su riqueza mineral ya que se han derivado de materiales geológicos entre los cuales sobresalen las cenizas volcánicas (Cortes, 2004).

La mayoría de bacterias desnitrificantes son aerobias facultativas, es decir, cuando tienen oxígeno disponible lo utilizan como aceptor terminal de electrones, pero en medios de humedad creciente, donde escasea el oxígeno utilizan el nitrato (Ingraham, 1998); algunos géneros de bacterias desnitrificantes son *Achromobacter*, *Rhodobacter*, *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, *Rhizobium* y *Pseudomonas* (Páres, 1997).

El Ciclo del Nitrógeno comprende las etapas de Fijación de Nitrógeno, Amonificación, Nitrificación y Desnitrificación. La fijación del nitrógeno atmosférico está dada por ciertos procariontes de vida libre y otros en asociación simbiótica, esta etapa consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) hasta amoniaco (NH_3); la comunidad telúrica lleva a cabo la mineralización o también llamada amonificación etapa en la que los sustratos orgánicos sufren un

largo proceso de degradación, la cual culmina con la transformación de los restos orgánicos en nitrógeno inorgánico asimilable por los vegetales y por los propios microorganismos, como resultado inmediato en esta etapa se produce amonio (NH_4); finalizada la mineralización se da paso a la nitrificación en la cual los microorganismos deben hacer uso de dos etapas porque no poseen el juego enzimático completo capaz de producir nitrógeno nitrato a partir de nitrógeno amonio. En una primera etapa el amonio se oxida hasta nitrito y, posteriormente, el nitrito es oxidado a nitrato (Gonzales, 2005). Finalmente las bacterias desnitrificantes permiten la reducción del nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2), y la formación de óxidos de nitrógeno, nitrógeno molecular o amoniacal, en un suceso anaeróbico, es decir, se lleva a cabo en ausencia de oxígeno (Des Abbayes, 1989). La cantidad de nitrógeno perdido a la atmósfera en el punto final de desnitrificación es relativamente pequeña en comparación con la que se cicla a través de los microbios del suelo, las plantas y los animales (Mukerji, 2006).

El nitrógeno, el fósforo y el potasio son algunos de los macronutrientes esenciales obtenidos del suelo para el crecimiento de las plantas; la mayor parte del nitrógeno asimilable por la planta proviene de nitrato añadido, ya sea como fertilizantes de nitrato o producidos a partir de amonificación y nitrificación en la rizósfera (Mukerji, 2006), la mayoría de los ecosistemas naturales y agrícolas aumenta su producción tras la fertilización con nitrógeno inorgánico, de ahí la importancia de este elemento (Zeiger, 2006). Una deficiencia de nitrógeno da lugar a plantas poco desarrolladas de hojas pequeñas de color verde amarillento, la maduración se ve acelerada como consecuencia se obtienen frutos pequeños y de poca calidad; un exceso de nitrógeno da lugar a un gran desarrollo aéreo, las hojas toman una coloración verdosa muy oscura y se retrasa la maduración (Oliveira, 2006).

La planta de estudio *Portulaca oleracea* también conocida como *P.cansanguina*, *P.intermedia*, *P.marginata*, *P.pusilla*, *P.retusa*, *Verdolaga*, *Verdolaguilla*, *Verdolaga del monte*, *Verdolaga cimarroncita* y *Verdolaga colorada* pertenece a la familia *Portulacáceae* originaria de la India y distribuida ampliamente en el trópico y subtropical de todo el mundo, es una planta de sitios soleados, ubicada en campos abiertos, sobre la arena, en el suelo arcilloso o en la ribera del río. Por lo general son plantas anuales postradas, ascendentes o en ocasiones erguidas, sus flores son amarillas, su tallo es largo (11-29 cm), sus hojas son alternas, subopuestas u opuestas, aplanadas, espatuladas, redondeadas a truncadas en el ápice (Madrigal, 2005).

Los resultados de este estudio permitirá conocer el estado de la diversidad metabólica del grupo funcional de bacterias desnitrificantes y de la comunidad microbiana asociada a la rizósfera de *Portulaca oleracea* en suelos de uso agrícola.

3. Planteamiento del problema

La pérdida de la comunidad microbiana se ha visto incrementada por la sobreexplotación y las inadecuadas prácticas agrícolas, la conservación de la diversidad genética y el uso sostenible de los agroecosistemas son temáticas de interés mundial, pues se ha demostrado que los microorganismos intervienen en el ciclaje de nutrientes y la fertilización de los suelos. La caracterización del componente microbiano en suelos sometidos a uso agrícola a partir del perfil metabólico del grupo funcional de las bacterias desnitrificantes y de la comunidad microbiana permitirá determinar el impacto de estos microorganismos en los agroecosistemas como criterio de uso sostenible del recurso.

4. Justificación

Esta investigación pretende explicar la importancia y función de las bacterias desnitrificantes en los agroecosistemas ya que si se entiende su dinámica en los ciclos se puede hacer un mejor uso de los suelos agrícolas. Para ello se aislarán cepas microbianas en las plantas *Portulaca oleracea* las cuales fueron colectadas Vereda Alquería Municipio de Villamaría Caldas. La información obtenida en este estudio contribuirá a hacer viable el uso del suelo teniendo como indicador la diversidad metabólica de la microbiota edáfica. La importancia de la biodiversidad microbiana en el funcionamiento del ecosistema radica en que los microorganismos están específicamente involucrados en los procesos de descomposición, mineralización y liberación de nutrientes.

En el departamento de Caldas el estudio de las comunidades microbianas edáficas no ha permitido considerar la importancia de los microorganismos en el funcionamiento de los ecosistemas, lo cual no permite que el componente microbiano sea considerado como criterio de uso sostenible del suelo. La poca información que hay no permite visualizar la relevancia o función de las bacterias desnitrificantes las cuales contribuyen con la biodiversidad y cumplen una función trascendental en la entrada de nitrógeno al ecosistema. Actualmente el mal uso del suelo y utilización de agroquímicos ha contribuido a generar poca productividad y estabilidad del mismo, reduciendo la diversidad de las bacterias en el suelo lo que impide que se lleven a cabo procesos de descomposición y ciclaje de nutrientes. Todo esto ha inspirado a realizar este estudio in vitro con el cual se permitirá determinar información sobre la actividad de los microorganismos ambientales concretamente de las bacterias desnitrificantes.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar la diversidad metabólica de la comunidad microbiana y de los aislamientos de bacterias desnitrificantes en la rizósfera de la especie de la planta *Portulaca oleracea*.

5.2 Objetivos específicos

Determinar las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias desnitrificantes presentes en la rizósfera de la planta *Portulaca oleracea*.

Evaluar el perfil bioquímico de los aislamientos de bacterias desnitrificantes en la rizósfera de la planta *Portulaca oleracea*.

Determinar las fuentes carbonadas utilizadas por el grupo funcional de las bacterias desnitrificantes por el Sistema Biology Ecoplate®.

6. Metodología

6.1 Lugar de muestreo

La muestra de suelos rizosféricos fueron colectados de la especie *Portulaca oleracea* en la Vereda Alquería ubicada a 1835 m.s.n.m (N 05° 01' 51,7" W 75° 31' 39") en el Distrito agrícola Villamaría Caldas Colombia. Tres individuos de la especie fueron seleccionadas de un área dedicada al cultivo comercial de hortalizas.

6.2 Caracterización fisicoquímica de los suelos

Se evaluaron variables de pH, Nitrógeno, Clima medio, Fosforo, Potasio, Calcio, Magnesio, Sodio, Hierro, Manganeso, Zinc, Cobre, Azufre, Boro, Arena, Limo, Arcilla y Textura (Tabla 1).

Tabla 1. Características suelo intervenido Vereda Alquería

	Unidades	Muestra	Cal	Niveles de Referencia		
				Bajo	Medio	Alto
pH	-	5,9	-	-	-	-
Aluminio	cmol(+)/kg	-	ND	<0,24	0,24 - 0,48	>0,48
Nitrógeno	%	0,35	-	-	-	-
Materia orgánica	%	-	-	-	-	-
Clima Frio	%	-	ND	<5,0	5,0 - 10,0	>10,0
Clima Medio	%	8,45	A	< 3,0	3,0 - 5,0	> 5,0
Clima Cálido	%	-	ND	<2,0	2,0 - 3,0	>3,0
Fósforo	mg/kg	204	A	< 20,0	20,0 - 40,0	> 40,0
Potasio	cmol(+)/kg	0,20	M	<0,2	0,2- 0,4	>0,4
Calcio	cmol(+)/kg	4,71	M	<3	3,0 - 6,0	>6,0
Magnesio	cmol(+)/kg	1,15	B	< 1,5	1,5 - 2,5	>2,5
Sodio	cmol(+)/kg	0,183	B	<0,5	0,5 - 1,0	> 1,0
Hierro	mg/kg	143	A	< 25	25,0 - 50,0	>50,0
Manganeso	mg/kg	14,89	A	<5,0	5,0 - 10,0	>10,0
Zinc	mg/kg	18,56	A	<1,5	1,5 - 3,0	> 3,0
Cobre	mg/kg	7,16	A	< 1,5	1,5 - 3,0	>3,0
Azufre	mg/kg	32,82	A	< 10,0	10,0 - 20,0	> 20,0
Boro	mg/kg	1,4	A	<0,2	0,2 - 0,4	>0,4
Arena	%	80		Calificación: B =bajo; M =Medio;		
Limo	%	20		A =Alto; ND = No Determinado		

Arcilla	%	0	
Textura	-	A-F	A-F= Arenoso Franco

Fuente: Laboratorio de química y fertilidad de suelos, Universidad de Caldas.

6.3 Recolección y procesamiento de la muestra

Se escogieron tres individuos de la especie *Portulaca oleracea*, la raíz se lavó 5 veces con agua destilada para retirar exceso de suelo, posteriormente la raíz lavada se sumergió en Hipoclorito de Sodio al 5% durante 5 minutos, luego se lavó nuevamente la raíz 3 veces con agua destilada estéril y se sumergió en buffer fosfato al 0,5 M durante 2,5 minutos, por último se lavó 5 veces con agua destilada estéril.

Se mezclaron 20g de rizósfera de los tres individuos y se inocularon 0,3g en 6 tubos con 10ml de Medio complejo (5 g de Peptona, 1g de Extracto de carne, 15g de Cloruro de Sodio NaCl, 10g de Nitrato de Potasio KNO₃ y 2g de Extracto de levadura en 800ml de agua destilada, pH 7.0) y en 6 tubos con 10 ml de Caldo Bouillon (10g de Nitrato de Potasio KNO₃ y 40g de BHI en 800ml de agua destilada, pH 7.4) (Alef, 1995). Se Incubo a 30°C durante tres semanas y se registró lectura de pH, turbidez, formación de nitritos con tiras indicadoras de nitritos.

Los Medios Complejo y Caldo Bouillon que presentaron resultados positivos para formación de nitritos fueron subcultivados en Agar BHI (37.22g de infusión cerebro corazón y 15g de agar en 1L de agua destilada, pH 7.4) realizando siembra por superficie y en Glucosa Nitrato Medio (10g de Peptona de carne, 5.0g de Cloruro de Sodio, 3.0g de Extracto de carne, 10g de Glucosa, 0.01g de Azul de Bromotimol, 1.0g de Nitrato de potasio y 4.0g de Agar en 1L de agua destilada, pH 7.4) realizando siembra por punción o picadura. Los medios se Incubaron a 30°C durante 1 semana.

Del Agar BHI se tomó una alícuota de las colonias que presentaban características distintas y se realizó siembra por agotamiento en Agar PDA (4.0g de Extracto de papa, 20g de Dextrosa, 15g de Agar en 1 L de agua destilada, pH 5.6). Las placas se incubaron a 30°C durante una semana.

6.4 Purificación y conservación de los aislamientos

Una vez obtenidas las colonias en el medio sólido PDA se procedió a realizar tres aislamientos adicionales con el fin de obtener colonias puras. Los aislamientos purificados fueron suspendidos en glicerol al 10% y se conservaron en viales a -20°C.

6.5 Caracterización morfológica de los aislamientos de bacterias desnitrificantes

La caracterización morfológica de los aislamientos se realizó mediante descripción macroscópica con ayuda del estereoscopio. En base a los resultados se registró la margen, el color, la densidad, la consistencia y la elevación de las colonias.

La descripción microscópica se realizó a través de tinción de Gram, para ello se tomó una alícuota de la colonia del Agar PDA y se resuspendió en un portaobjetos el cual contiene una gota de agua destilada estéril, se calentó hasta que toda el agua se evaporó y se procedió a cubrir la placa con cristal violeta durante 1 minuto, se lavó, se agregó Lugol por 1 minuto, se lavó, se añadió alcohol acetona durante 30 segundos, se lavó y por último se adiciono Safranina durante 45 segundos (Forbes, 2009).

6.6 Pruebas bioquímicas e identificación presuntiva

Se realizaron 21 pruebas bioquímicas para identificar el género de las bacterias. Los medios y/o pruebas utilizados fueron: Caldo Glucosa (6.0g Extracto de carne, 10g Tripteína, 10g de glucosa y 5.0g Cloruro de Sodio en 1 L de agua destilada, pH 7.0), Caldo Maltosa (5.0g Cloruro de Sodio, 10g Peptona de Caseína y 5.0g de Maltosa en 1 L de agua destilada, pH 7.4), Caldo

Sacarosa (5.0g Cloruro de Sodio, 10g Peptona de Caseína y 5.0g de Sacarosa en 1 L de agua destilada, pH 7.4), Caldo Lactosa (3.0g Extracto de carne, 5.0g Peptona y 5.0g de Lactosa en 1 L de agua destilada, pH 6.9), Caldo Rafinosa (5.0g Cloruro de Sodio, 10g Peptona de Caseína y 5.0g de Rafinosa en 1 L de agua destilada, pH 7.4), Caldo Arabinosa (5.0g Cloruro de Sodio, 10g Peptona de Caseína y 5.0g de Arabinosa en 1 L de agua destilada, pH 7.4), Caldo Sorbitol (5.0g Cloruro de Sodio, 10g Peptona de Caseína y 5.0g de Sorbitol en 1 L de agua destilada, pH 7.4), Caldo Inositol (5.0g Cloruro de Sodio, 10g Peptona de Caseína y 5.0g de Inositol en 1 L de agua destilada, pH 7.4), Agar Manitol (1.0g Extracto de carne, 10g Pluripeptona, 10g D-Manitol, 75g Cloruro de Sodio, 15g Agar y 0.025g Rojo de Fenol en 1L de agua destilada, pH 7.4), Agar MIO (1.0g Glucosa, 3.0g Extracto de Levadura, 10g Peptona, 10g Tripteína, 5.0g Clorhidrato de L-Ornitina, 0.02g Púrpura de Bromocresol y 2.0g de Agar en 1 L de agua destilada, pH 6.5) , Agar TSI (3.0 g Extracto de carne, 20.0g Pluripeptona, 5.0g Cloruro de Sodio, 10.0g Lactosa, 10.0g Sacarosa, 1.0g Glucosa, 0.2g Sulfato de hierro y amonio, 0.2g Tiosulfato de Sodio, 0.025g Rojo de fenol y 13.0g de Agar en 1 L de agua destilada, pH 7.3), Agar LIA (5.0g Peptona de gelatina, 3.0g Extracto de levadura, 1.0g Glucosa, 10.0g Lisina, 0.5g Citrato de hierro y amonio, 0.04g Tiosulfato de Sodio, 0.02g Púrpura de Bromocresol, 15g de Agar en 1 L de agua destilada, pH 6.7), Agar Citrato (2.0g Citrato de Sodio, 5.0g Cloruro de Sodio, 1.0g Fosfato dipotásico, 1.0g Fosfato monoamónico, 0.2g Sulfato de Magnesio, 0.08g Azul de Bromotimol y 15g de Agar en 1L de agua destilada, pH 6.9), Agar Urea (1.0g Tripteína, 1.0g Glucosa, 5.0g Cloruro de Sodio, 2.0g Fosfato monopotásico, 0.012 rojo de fenol y 15g de Agar en 1L de agua destilada, pH 6.8) , Agar Gelatina (10g Peptona, 5.0g Cloruro de Sodio, 5.0g Extracto de carne, 4.8g Gelatina y 15g de Agar en 1L de Agua destilada, pH 7.2), Agar MRVP (7.0g Pluripeptona, 5.0g Glucosa y 5.0g Fosfato dipotásico en 1L de Agua destilada, pH 6.9), Agar Glucosa Nitrato (10g de Peptona de

carne, 5.0g de Cloruro de Sodio, 3.0g de Extracto de carne, 10g de Glucosa, 0.01g de Azul de Bromotimol, 1.0g de Nitrato de potasio y 4.0g de Agar en 1L de agua destilada, pH 7.4), Agar Almidón (3.0g Extracto de carne, 6.0g Cloruro de Sodio, 2.0g Almidón, y 12g Agar en 1L de Agua destilada), Agar Litmus Milk (100g Leche, 0.5g Litmus y 0.5g Sulfito de Sodio en 1L de Agua destilada, pH 6.8), test de Oxidasa y Catalasa (Granados, 1997). Se llevó a incubar a 30°C durante 48 horas, y se realizaron identificaciones taxonómicas siguiendo el Manual de Bergey's.

6.7 Sistema Biology Ecoplate®

Para determinar las fuentes de carbonadas utilizadas por la comunidad microbiana y las bacterias Desnitrificantes se utilizó el sistema Biology Ecoplate® que consta de 31 fuentes carbonadas por triplicado. Para ello se diluyeron las colonias en una solución buffer salina de fosfato estéril o PBS (8,5 g NaCl, 0,3 g KH₂PO₄, 1,12 g Na₂HPO₄·7H₂O, aforar a 1L con agua destilada H₂O y pH 6,8). Se escogió el número exacto de bacterias para inocular con escala 0,5 McFarland. Se pesaron 2 gramos de suelo y se disolvieron en 18 ml de PBS. Se removieron 3 ml de la dilución 10⁻¹ y se inocularon 3 ml en 27 ml de PBS, la solución debe ser apenas turbia. Se sirvieron 50 ml de la solución diluida en una caja de Petri. Con una pipeta multicanal se añadieron 100µl de la suspensión para inocular cada una de las celdas del Ecoplate. Se Incubaron las placas a temperatura ambiente en bolsas plásticas, se colocó una toalla húmeda adentro de las bolsas para mantener un nivel de humedad constante y evitar la evaporación de las celdas.

Se revisaron las placas Ecoplate diariamente y se registraron los datos durante cuatro 4 días registrando las celdas que muestren cambio de color a púrpura, poco púrpura y ausencia de color. El tiempo de incubación del ensayo duró 4 días (Puterbaugh, 2007).

7. Resultados

7.1 Aislamiento de bacterias Desnitrificantes

Las variables que se tomaron en cuenta para determinar el crecimiento microbiano en el Medio Complejo y Caldo Bouillon en los 6 tubos inoculados con rizósfera de la especie de la planta *Portulaca oleracea* mostraron resultados positivos (Tabla 2).

Tabla 2. Aislamientos de bacterias desnitrificantes en Medio Complejo y Caldo Bouillon

<i>Portulaca oleracea</i>	Medio complejo						Caldo Bouillon					
	Aislamientos						Aislamientos					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Formación de gas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH	9	9	9	9	9	9	7	8	9	7	9	9
Nitritos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Los aislamientos en agar BHI presentaron diferencias morfológicas como se muestra en la Figura 1. El total de aislamientos en el Agar Glucosa Nitrato Medio mostró turbidez que se extiende más allá de la línea de inoculación.

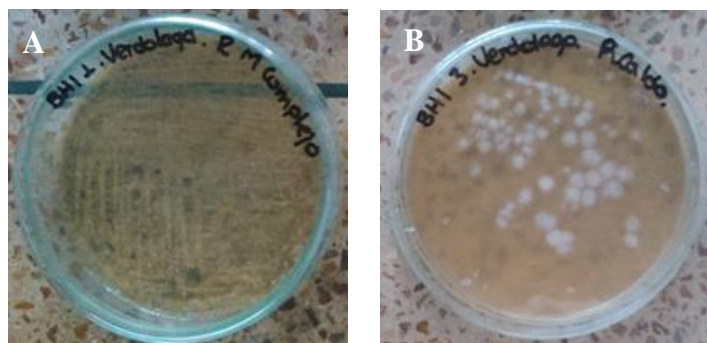






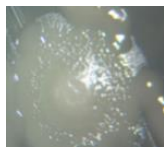
Figura 1. Aislamientos en Agar BHI. **A)** Colonias de color amarillo pálido, redondas, bordes regulares, cremosas y convexas. **B)** Colonias de color blanco, redondas, bordes irregulares, opacas, secas y planas.

7.2 Caracterización morfológica de los aislamientos de bacterias desnitrificantes

Se logró identificar cinco características morfológicas en Agar PDA, macroscópicamente se observan colonias de color blanco, cremosas, convexas, tres de ellas poseen forma y margen irregular dos de ellas son circulares con forma regular (Tabla 3). Microscópicamente se observaron Bacilos Gramnegativos y Bacilos Grampositivos esporulados (Figura 2).

Tabla 3. Caracterización morfológica de cinco aislamientos de la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea*.

Colonia	Tinción Gram	Forma	Margen	Color	Consistencia	Elevación
 Aislamiento 1	Bacilos Gram Negativos	Circular	Regular	Blanco	Cremosa	Convexa
 Aislamiento 2	Bacilos Gram Negativos	Circular	Regular	Blanco	Cremosa	Convexa
 Aislamiento 3	Bacilos Gram positivos esporulados	Irregular	Irregular	Blanco	Cremosa	Convexa
 Aislamiento 4	Bacilos Gram positivos esporulados	Irregular	Irregular	Blanco	Cremosa	Convexa



Bacilos Gram

positivos

Irregular

Irregular

Blanco

Cremosa

Convexa

esporulados

Aislamiento 5

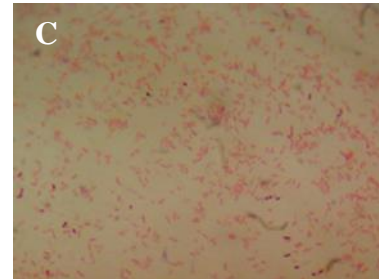
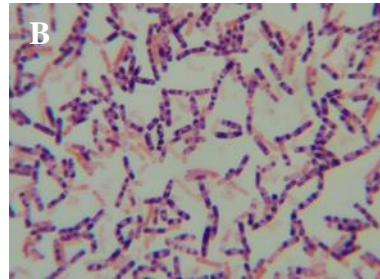
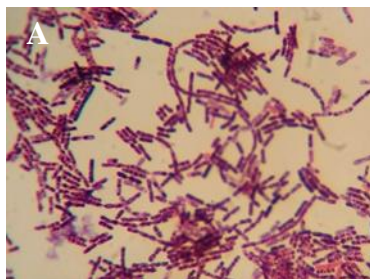


Figura 2. Tinción de Gram. **A)** Bacilos Grampositivos esporulados **B)** Bacilos Grampositivos esporulados **C)** Bacilos Gramnegativos.

7.3 Pruebas bioquímicas e identificación presuntiva

El perfil bioquímico se realizó utilizando técnicas convencionales las cuales permitieron determinar las características metabólicas de los aislamientos e identificar el género presuntivo de las bacterias. Los cinco aislamientos presentaron crecimiento exitoso en los caldos glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, rafinosa, arabinosa, sorbitol e inositol. Todos los aislamientos presentaron resultados negativos para la fermentación de Manitol, licuefacción de la gelatina, síntesis del almidón, test de oxidasa, producción de Indol, Gas y producción de SH_2 . Se realizó recopilación de todos los resultados obtenidos y se comparó con el perfil macroscópico, microscópico y bioquímico de algunas bacterias desnitrificantes según el Manual de Bergey's deduciéndose el aislamiento de posibles géneros de *Pseudomonas spp* y *Bacillus spp* (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización bioquímica de los cinco aislamientos.

Medios de cultivo	Aislamiento	Aislamiento	Aislamiento	Aislamiento	Aislamiento
	1	2	3	4	5
Caldo glucosa	+	+	+	+	+
Caldo maltosa	+	+	+	+	+
Caldo sacarosa	+	+	+	+	+
Caldo lactosa	+	+	+	+	+
Caldo rafinosa	+	+	+	+	+
Caldo arabinosa	+	+	+	+	+
Caldo sorbitol	+	+	+	+	+
Caldo inositol	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-
AGAR MIO					
Movilidad	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-
Ornitina	+	+	+	+/-	+
AGAR TSI	K/K	K/K	K/A	K/A	K/A
Fermentación Glucosa	-	-	+	+	+
Fermentación Glucosa, Lactosa y Sacarosa	-	-	-	-	-
No Fermentador	+	+	-	-	-
Producción de Gas	-	-	-	-	-
Producción de SH ₂	-	-	-	-	-
AGAR LIA					
Descarboxilación de Lisina	+	+	+	+/-	+
Desaminación de Lisina	-	-	-	-	-
Producción SH ₂	-	-	-	-	-
AGAR CITRATO	+	+	+	+/-	+/-
AGAR UREA	-	+/-	+	+	+
AGAR GELATINA	-	-	-	-	-
AGAR MRVP					
Crecimiento	+	+	+	+	+
Prueba Rojo de Metilo	-	-	+	+	+
Prueba de Voges Proskauer	+	+	+	+/-	+
AGAR GLUCOSA NITRATO					
Movilidad	+	+	+	+	+
Oxidación de la glucosa	-	-	+/-	+	+
Fermentación de la glucosa	-	-	+/-	+	+
Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+

AGAR ALMIDÓN	-	-	-	-	-
AGAR LITMUS MILK					
Fermentación de la lactosa (ácido rojo)	-	-	-	-	-
Reducción del tornasol	-	-	-	-	-
Formación de coágulo	+	+	+	+	+
Peptonización	-	-	-	-	-
Formación de gas	-	-	-	-	-
OXIDASA	-	-	-	-	-
CATALASA	+	+	+	+	+
Aislamiento presuntivo	<i>Pseudomonas spp</i>		<i>Bacillus spp</i>		

7.4 Sistema Biology Ecoplate®

El análisis cualitativo de la comunidad microbiana asociada a la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea* realizado a las 31 fuentes carbonadas del sistema Ecoplate, demostró que 25 fuentes carbonadas fueron positivas para todas las réplicas, 5 fuentes carbonadas fueron negativas para todas las réplicas, 1 fuente carbonada fue positiva para una de las tres replicas, lo cual arrojo una diversidad funcional del 83% (Tabla 5). Para las bacterias desnitrificantes asociadas a la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea* 23 fuentes carbonadas fueron positivas para todas las réplicas y 8 fuentes carbonadas fueron negativas para todas las réplicas, lo cual arrojo una diversidad funcional del 74.19% (Tabla 6).

La degradación los de carbohidratos como la D-celobiosa y la D-xilosa en Ecoplate permiten inferir sobre el potencial enzimático de una comunidad microbiana, el resultado de degradación de la comunidad microbiana de la especie *Portulaca oleracea* para disacárido la D-celobiosa y el monómero D-xilosa fue positivo para las tres replicas.

Tabla 5. Fuentes carbonadas utilizadas por la comunidad microbiana de *Portulaca oleracea*.

Fuente carbonada	1	2	3
Water			
βMethyl-D-Glucoside	+	+	+
D-Galactonic Acid γ-Lactone	+	+	+
L-Arginine	+	+	+
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	+	+
D-Xylose	+	+	+
D-Galacturonic Acid	+	+	+
L-Asparagine	+	+	+
Tween 40	+	+	+
i-Erythritol	+	+	+
2-Hydroxy Benzoic Acid	-	-	-
L-Phenylalanine	+	+	+
Tween 80	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+
4-Hydroxy Benzoic Acid	+	+	+
L-Serine	+	+	+
αCyclodextrin	+	+	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+
γ-Hydroxybutyric Acid	-	-	-
L-Threonine	-	-	-
Glycogen	+	+	+
D-Glucosaminic Acid	+	+	+
Itaconic Acid	+	+	+
Glycyl-L Glutamic Acid	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+
Glucose-1-Phosphate	+	+	+
α-Ketobutyric Acid	-	-	-
Phenylethylamine	+	+	+
α-D-Lactose	+	-	-
D, L-α-Glycerol Phosphate	-	-	-
D-Malic Acid	+	+	+
Putrescine	+	+	+
Fuentes de carbono positivas para las tres réplicas			25
Fuentes de carbono negativas para todas las tres réplicas			5
Fuentes de carbono positivas para 2 de las 3 réplicas			0
Fuentes de carbono positivas para 1 de las 3 réplicas			1
% de Diversidad Funcional			83%

Tabla 6. Fuentes carbonadas utilizadas por el grupo funcional de Bacterias Desnitrificantes.

Fuente carbonada	1	2	3
Water			
βMethyl-D-Glucoside	+	+	+
D-Galactonic Acid γ-Lactone	+	+	+
L-Arginine	+	+	+
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	+	+
D-Xylose	+	+	+
D-Galacturonic Acid	+	+	+
L-Asparagine	+	+	+
Tween 40	+	+	+
i-Erythritol	+	+	+
2-Hydroxy Benzoic Acid	-	-	-
L-Phenylalanine	+	+	+
Tween 80	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+
4-Hydroxy Benzoic Acid	+	+	+
L-Serine	+	+	+
αCyclodextrin	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+
γ-Hydroxybutyric Acid	-	-	-
L-Threonine	+	+	+
Glycogen	-	-	-
D-Glucosaminic Acid	+	+	+
Itaconic Acid	+	+	+
Glycyl-L Glutamic Acid	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+
Glucose-1-Phosphate	+	+	+
α-Ketobutyric Acid	-	-	-
Phenylethylamine	+	+	+
α-D-Lactose	-	-	-
D, L-α-Glycerol Phosphate	-	-	-
D-Malic Acid	+	+	+
Putrescine	-	-	-
Fuentes de carbono positivas para las tres réplicas			23
Fuentes de carbono negativas para todas las tres réplicas			8
Fuentes de carbono positivas para 2 de las 3 réplicas			0
Fuentes de carbono positivas para 1 de las 3 réplicas			0
% de Diversidad Funcional			74.19%

8. Discusión

Investigaciones realizadas por Cerón y Malgarejo (2005) (Citados por Ramírez, 2009) indican que la calidad del suelo está determinada por características biológicas, físicas y químicas, mientras que la salud del mismo esta mediada por sus características ecológicas; también determinan que el estudio de la biomasa y la actividad de los microorganismos del suelo sirve como indicadores de cambios ambientales y que estos sumados a las condiciones geográficas y a los factores antropogénicos (contaminación y el manejo agrícola) tienen influencia directa sobre la actividad enzimática de los suelos, promoviendo la pérdida de materia orgánica, reduciendo la fertilidad, afectando la resistencia y resiliencia de los mismos.

Una investigación realizada por Castro (1995) indica que la biomasa y la materia orgánica disminuyen cuando el suelo es sometido a actividad agrícola; Cruz (2012) señala que la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Sulfato de amonio y Urea), al igual que la adición de los biocidas altera significativamente la actividad microbiana del suelo y favorecen la pérdida del carbono almacenado.

Estudios realizados por Benavidez et al. (2006) presentan los resultados de la versatilidad, adaptativa y tolerancia de un consorcio bacteriano de bacterias desnitrificantes expuesto al uso incontrolado de fertilizantes nitrogenados, los organismos encontrados fueron *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter sp*, *Propionibacterium sp*, *Peptoestreptococcus sp*, *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Corynebacterium sp*, *Clostridium sp* y *Actinomyces sp*. Otro estudio realizado por Velázquez et al. (2002) determinan un consorcio de bacterias desnitrificantes constituido por *Sphingomonas paucimobilis*, *Aci.*

Johnsonii, *Chryseomonas luteola*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Sphingomonas paucimobilis* en un reactor de tratamientos de aguas.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron identificar especies presuntivas de *Pseudomonas spp* y *Bacillus spp*. Según Cano (2011) algunas especies del género *Pseudomonas spp* son catalogadas como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), y que además pueden ejercer un efecto benéfico directo protegiendo a las plantas de infecciones por agentes fitopatógenos, a través de la síntesis de fitohormonas y de vitaminas, estimulación de la germinación de semillas, la inhibición de la síntesis de etileno y solubilización de fósforo inorgánico. Márquez (2007) indica que Muchas especies de *Bacillus spp* producen enzimas hidrolíticas que se encargan de degradar los compuestos que están disponibles en el suelo como son polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, lo que permite a estas bacterias usar dichos productos como fuente de carbono.

Las características fisicoquímicas de los suelos para los microorganismos de la rizósfera asociada a la especie de la Planta *Portulaca oleracea* se caracterizan por tener un pH de 5.9, con contenidos altos de Fosforo, Hierro, Zinc, Boro, Cobre, Azufre y Manganeso, y contenidos bajos de Magnesio y Sodio.

En la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea*, fue posible obtener 5 aislamientos de bacterias desnitrificantes de los cuales la identificación presuntiva permitió determinar 2 géneros de *Pseudomonas spp* y 3 géneros de *Bacillus spp*.

El perfil metabólico a partir de las fuentes carbonadas de la comunidad microbiana heterótrofa asociada a la rizósfera de *Portulaca oleracea* arrojó un Porcentaje de Diversidad Funcional del 83%, mostrando mayor potencial metabólico para el aprovechamiento de sustratos en el suelo en

contraste el grupo funcional de las bacterias desnitrificantes asociadas a la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea*, que mostró un Índice de Diversidad Funcional del 74.19%. La comunidad microbiana mostró habilidad para asimilar ácidos carboxílicos (D-Galactonic Acid y-Lactone, Pyruvic Acid Methyl Ester, D-Galacturonic Acid, D-Glucosaminic Acid, 4-Hydroxy Benzoic Acid, Itaconic Acid y D-Malic Acid), aminoácidos (L-Arginine, L-Asparagine, L-Phenylalanine, L-Serine y Glycyl-L Glutamic Acid), carbono-fosfato (Glucose-1-Phosphate), carbono complejo (Tween 40, Tween 80, α Cyclodextrin y Glycogen), carbohidratos (β Methyl-D-Glucoside, D-Xylose , i-Erythritol, D-Mannitol, N-Acetyl-D-Glucosamine y D-Cellobiose) y Aminas (Phenylethylamine y Putrescine). Los aislamientos de bacterias desnitrificantes mostraron similitud metabólica al actuar sobre ácidos carboxílicos (D-Galactonic Acid y-Lactone, Pyruvic Acid Methyl Ester, D-Galacturonic Acid, 4-Hydroxy Benzoic Acid, D-Glucosaminic Acid, Itaconic Acid y D-Malic Acid), aminoácidos (L-Arginine, L-Asparagine, L-Phenylalanine, L-Serine, L-Threonine y Glycyl-L Glutamic Acid), carbono-fosfato (Glucose-1-Phosphate), carbono complejo (Tween 40 y Tween 80), carbohidratos (β Methyl-D-Glucoside, D-Xylose, i-Erythritol, D-Mannitol, N-Acetyl-D-Glucosamine y D-Cellobiose) y aminas (Phenylethylamine). La comunidad microbiana y el grupo de bacterias desnitrificantes mostraron menos actividad metabólica por 2-Hydroxy Benzoic Acid, γ -Hydroxybutyric Acid, α -Ketobutyric Acid y D, L- α -Glycerol Phosphate.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos del perfil bioquímico de los morfotipos de bacterias desnitrificantes manifestaron un bajo potencial enzimático debido a que este tipo de bacterias no poseen un alto poder fermentativo, esta característica se ve más arraigada en el género *Pseudomonas spp* que en el género *Bacillus spp*.

9. Conclusiones

Se realizó la identificación presuntiva de los géneros *Pseudomonas spp* y *Bacillus spp* como bacterias Desnitrificantes asociadas a la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea*.

El perfil metabólico de la comunidad microbiana asociada a la rizósfera de *Portulaca oleracea* arrojó un porcentaje de diversidad funcional del 83%, mostrando mayor potencial metabólico para el aprovechamiento de sustratos en el suelo en contraste con el grupo funcional de las bacterias Desnitrificantes asociadas a la rizósfera de la especie *Portulaca oleracea* que demostró un índice de diversidad funcional del 74.19%.

10. Bibliografía

- Alef, K. y. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
- Anaya, A. E. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. . Mexico: PYV.
- Arias, A. (2001). *Suelos Tropicales*. Costa Rica : EUNED.
- Benavides, J. Q. (2006). Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla en la Laguna de Tota, Boyacá, Colombia. . *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*, 50-54.
- Cano, M. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, Trichoderma spp. y Pseudomonas spp. Una revisión. . *Scielo*, 15-31.
- Casanova, E. (2005). Introducción a la ciencia del suelo. Venezuela : CDCH.
- Castro, L. (1995). Efecto del uso agrícola y el barbecho sobre los contenedores de biomasa microbiana de ultisoles y andisoles de Costa Rica . *Agronomía Costarricense*, 1-7.
- Cerón, L. y. (2005). Enzimas del suelo: Indicadores de salud y enfermedad . *Acta Biológica Colombiana*, 5-18.
- Corpoica. (2007). *Guía Tecnológica Para El Manejo Integral Del Sistema Productivo de la Cana Panelera*. Bogotá: Produmedios.
- Cortes, A. (2004). *Suelos colombianos: una mirada desde la academia*. Bogotá. D.C: Fundación Universitaria de Bogotá Jorge Tadeo Lozano .

- Cruz, A. C. (2012). La biomasa microbina en suelos de montaña con diferentes usos: Un estudio de laboratorio. *Terra Latinoamericana*, 221-228.
- Des Abbayes, H. C. (1989). *Botánica: vegetales inferiores*. Paris: Reverté.
- Forbes, B. S. (2009). *Diagnostico Microbiológico*. Argentina : Médica Panamericana .
- Gonzales, P. y. (2005). Estudio de grupos funcionales de microorganismos edáficos en la rizósfera de *Alnus glutinosa*. España: ProQuest ebrary.
- González P, J. M. (2005). Estudio de grupos funcionales de microorganismos edáficos en la rizósfera de *Alnus glutinosa* (L.). España : ProQuest ebrary.
- Granados, R. y. (1997). *Microbiología: Bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general, parasitología general*. España: S.A. EDICIONES PARANINFO.
- Ingraham, J. y. (1998). *Introducción a la microbiología. II*. España : Reverté S. A.
- Joaquín, L. B. (2006). Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla en la Laguna de Tota, Boyacá, Colombia. *Universidad de la Salle* , 51.
- Macía, L. I. (2007). Nuevas perspectivas de la ecología microbiana en la producción agrícola. *Ciencia Nicolaita*, 79.
- Madrigal, B. y. (2005). *Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica colombiana*. Antioquia : Unisidad de Antioquia .

- Márquez, F. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. . *Universidad Austral de Chile*, Chile .
- Medina, M. (2012). Caracterización bioquímica y microbiológica de un suelo de pradera de «*dactylis glomerata*» y «*medicago sativa*» bajo diferentes proporciones de siembra. España: Ediciones Universidad de Salamanca .
- Mukerji, K. M. (2006). *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Núñez, J. (2001). *Manejo y Conservación de Suelos*. Costa Rica: EUNED.
- Olalde, V. y. (1998). *Microorganismos y Biodiversidad*. . *Tierra*, 290.
- Oliveira, J. A. (2006). *Análisis de suelos y plantas y recomendaciones de abonado*. Asturias: Universidad de Oviedo.
- Páres, R. y. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. España: Reverté.
- Paz, J. (2006). *Propiedades bioquímicas de los suelos de Prado de Galicia*. Santiago de Compostela : Universidad de Santiago de Compostela .
- Puterbaugh, M. y. (2007). *Environmental Microbial Ecology. Tested Studies for Laboratory Teaching*, 28-51.
- Ramírez, T. (2009). Efecto de agroquímicos en las propiedades físico-químicas y biológicas en los suelos de Táchira-Venezuela. *Universidad Industrial de Santander*, 14-56.
- Rodríguez, J. M. (2009). Valoración de la Biodiversidad en la Ecorregión del Eje Cafetero. *CIEBREG*, 11.

Rosa, D. (2008). *Evaluación agro-ecológica de suelos para un desarrollo rural sostenible*.
Barcelona: Mundi-Prensa.

Silva, S. y. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: Revisión de la normativa y
posibilidades de regulación económica. . *Scielo*, 15.

Suarez, F. (1979). *Conservacion De Suelos*. Costa Rica : IICA.

Vallejo, V. E. (2013). Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el
componente microbiano: Experiencias en sistemas silvopastoriles . *Scielo*, 84-85.

Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. California: Taiz Lincoln.