



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
Estación Experimental Santa Catalina

FECHA DE PRESENTACIÓN: Octubre 2010

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMAS: Maíz / Biotecnología

ÁREA DE TRABAJO: Microbiología y Biología Molecular.

PROYECTO: Uso y conservación de la biodiversidad de cepas de *Azospirillum* spp. para la producción y validación de un biofertilizante para el cultivo de maíz en la Sierra del Ecuador.

ACTIVIDAD: Identificación y Caracterización Molecular del Banco de Cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP aisladas de cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la Sierra Ecuatoriana.

UBICACIÓN:
Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglagua
Altitud: 3.058 m

AUTOR(S): Egda. Andrea Greta Carrera González

CO AUTOR(S): Ing. MSc. Carlos Yánez
Dr. Eduardo Morillo

COLABORADORES: Ing. Gabriela Miño

FECHA DE INICIO: Noviembre 2010

FECHA DE TERMINACIÓN: Noviembre 2011

PRESUPUESTO: \$ 10471,77

FUENTES DE FINANCIAMIENTO: 100 % INIAP

1. ANTECEDENTES

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes en la sierra del Ecuador debido a que se destinan aproximadamente 202.966 ha de terreno para su siembra, según el INEC (2009), y por el papel que cumple como componente básico de la dieta de la población rural (Yáñez, 2007). La producción y comercialización del maíz en nuestro país es realizada por pequeños y medianos productores, cuyos terrenos se caracterizan por presentar deficiencias en nutrientes y en sus métodos de siembra aún prevalecen prácticas tradicionales definidas por la escasa o nula utilización de fertilizantes debido a sus altos costos, lo cual reduce de manera significativa los rendimientos del cultivo (INIAP, 2007).

La solución a este problema no es fácil, ya que el incremento en los precios del petróleo incide en los costos de los fertilizantes inorgánicos; además, al no tener un manejo apropiado de éstos contribuyen con la problemática actual de la contaminación ambiental (INIFAP, 2008). Hoy en día, el empleo de biofertilizantes en cultivos agrícolas esta siendo una alternativa muy prometedora, ya que se han reportado en estudios diversas ventajas de esta tecnología como: la reducción a la mitad de los requerimientos de fertilizantes inorgánicos sin afectar la productividad del cultivo, al mismo tiempo brinda la disminución considerable de la contaminación ambiental y permite abaratar costos de inversión agrícola (INIFAP, 2009).

Se denomina como 'biofertilizante' a un producto que contiene uno o varios microorganismos del suelo y puede ser aplicado a la semilla o al suelo con el fin de incrementar su número, asociarse directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favorecer su interacción e incrementar el desarrollo vegetal y reproductivo de la planta (INIFAP, 2009). En la actualidad, existe un gran interés sobre biofertilizantes elaborados a base de microorganismos bacterianos procedentes de la rizósfera del suelo (rizobacterias) tales como: *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Azotobacter* spp. y actinomicetos como *Frankia* spp. (Sprent y Sprent, 1990), debido a los efectos benéficos que estos tienen sobre las plantas (Schroth y Hancock, 1982).

Se considera a *Azospirillum* como uno de los géneros de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) más estudiados en la actualidad, debido a su efecto benéfico sobre el crecimiento vegetal. Los resultados recopilados de 20 años de estudios en este género han demostrado que entre el 60 y 70% de los experimentos llevados a cabo han tenido éxito, con un incremento significativo en la producción de pastos, cereales (trigo, maíz y arroz) y caña de azúcar que varía entre el 5 y 30%. Este efecto estimulante se ha atribuido a diversos mecanismos, entre los cuales se encuentra: la fijación de nitrógeno y la producción de reguladores de crecimiento. Respecto a la primera, se ha cuestionado mucho que este sea un factor importante, ya que las cantidades de N fijadas por la bacteria no son muy significativas (3-100kg ha/año); ante esto, tiene mayor consideración la producción de sustancias promotoras del crecimiento (Collados, 2006). *Azospirillum* tiene la capacidad de producir y metabolizar reguladores de crecimiento vegetal del tipo auxinas como el Acido Indol Acético (AIA) (Okon y Labandera-González, 1994), citocininas y giberelinas (Caballero, 2001).

El Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP cuenta con una colección de 20 cepas nativas de *Azospirillum* spp., las cuales fueron aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz de diversas provincias de la sierra ecuatoriana. Con estas cepas se han realizado estudios en: (1) laboratorio, donde se logró identificar con pruebas fenotípicas y bioquímicas que nueve de las veinte cepas nativas, incluida una cepa certificada, corresponden al género en estudio (Espinoza, 2004); (2) en invernadero, donde se observó un mejor crecimiento de la parte radicular y foliar de las plantas inoculadas con las nueve cepas comparadas con el testigo sin inocular (INIAP, 2004); y (3) en campo donde se evaluaron las tres mejores cepas (c2-Bolivar; c3-Tungurahua y c4-Chimborazo), observándose que la cepa

4 fue la más eficiente en cuanto al rendimiento en choclo con 216,80 sacos/ha, comparado con las plantas testigo sin inocular que tuvieron un rendimiento de 157,84 sacos/ha (Cool, 2010).

También se ha evaluado la interacción de fertilizantes inorgánicos con las cepas, observándose que los tratamientos: c2fc (cepa2 -Bolívar+fertilización inorgánica completa 100%) obtuvo un rendimiento de 183,74 sacos/ha, mientras que el tratamiento c2fm (c2-Bolívar+fertilización inorgánica media 50%), fue el más eficiente, con un rendimiento de 258,25 sacos/ha superando al rendimiento obtenido por el Programa de Maíz con fertilización inorgánica al 100 % sin cepas que fue de 215 sacos/ha (Cool, 2010). Los resultados de estas evaluaciones agronómicas motivaron a incorporar la tecnología de elaborar un biofertilizante en base a estas cepas; pero hasta el día de hoy, de éstas solo se registran estudios sobre su aplicación agrícola y no de su identificación taxonómica. Actualmente, se encuentra en vigencia todo tipo de investigaciones para identificar de forma taxonómica a microorganismos de interés agronómico, mediante el empleo de diversas técnicas microbiológicas, inmunológicas y moleculares (Rodicio y Mendoza, 2004).

En los últimos años en otros países, se han realizado estudios moleculares para caracterizar cepas específicamente de *Azospirillum*, usando una combinación de aislamientos tradicionales y detección molecular mediante técnicas de PCR- fingerprinting (Kirchhof *et al.*, 1997); reportándose estudios como: aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* termo-tolerantes de una laguna aireada de tratamiento de efluentes mediante la amplificación por PCR del gen 16Sr (Yu y Mohn, 2001); amplificación del gen 16Sr para identificar células bacterianas pertenecientes a *Azospirillum* en las raíces del manglar negro *Avicennia marina*, que presentan tolerancia salina, un gran potencial para mejorar el cultivo en campo costero de frejol y arroz (Ravikumar *et al.*, 2002); impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz (Collados 2006); entre otros. Estos estudios añaden un gran valor científico a *Azospirillum*: por lo que, realizar más investigaciones sobre esta bacteria contribuiría a un mejor conocimiento y manejo de la misma promoviendo el desarrollo de una agricultura sostenible en el Ecuador.

II. JUSTIFICACIÓN

La elaboración de un biofertilizante en base a las cepas de *Azospirillum* spp. favorecería en gran manera la producción del cultivo de maíz de la sierra ecuatoriana y forjaría una tecnología amigable con el medio ambiente; por ello, el Programa de Maíz se ve en la necesidad de continuar realizando investigaciones con este género bacteriano; pero, para llevar a cabo cualquier tipo de estudio sobre el potencial de estas cepas es necesario realizar una identificación más precisa de las mismas. Por lo tanto, esta investigación busca nombrar taxonómicamente (Género y especie) a los ejemplares del banco de cepas de *Azospirillum* del INIAP que fueron aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz de altura, mediante la aplicación de pruebas microbiológicas y técnicas moleculares.

Este estudio es de gran importancia y autenticidad debido a que en el Ecuador no se han realizado investigaciones sobre identificación y caracterización molecular de especies del género *Azospirillum*; además, la caracterización taxonómica de estas cepas contribuiría a entender la naturaleza organizativa de la biodiversidad de este género bacteriano a nivel de provincias de la sierra ecuatoriana y permitiría conocer cómo trabajan en su hábitat natural para encontrar soluciones a problemas ambientales como: la degradación y pérdida de suelos agrícolas.

Por último, el uso de técnicas microbiológicas y moleculares en esta investigación tiene comprendido las estrategias de conservación y optimización del uso del banco de cepas de *Azospirillum* del INIAP; y de igual forma a contribuir significativamente en la tecnología de elaboración un biofertilizante basado en las

mejores cepas identificadas y evaluadas, para posteriormente ser patentado generando un producto confiable y garantizado a nivel agronómico y comercial.

III. OBJETIVOS

General

Identificar y caracterizar molecularmente el Banco de cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP aisladas del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la Sierra ecuatoriana.

Específicos

- Evaluar el efecto de las cepas de *Azospirillum* spp. sobre el crecimiento de maíz de la variedad INIAP-101 bajo condiciones *in vitro* e invernadero
- Identificar mediante pruebas microbiológicas y herramientas moleculares el género y especie de las cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP
- Determinar la variabilidad genética del Banco de cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP.

IV. HIPÓTESIS

H₀₁: Las cepas de *Azospirillum* spp. al ser inoculadas en semillas de maíz no manifiestan ningún efecto en el desarrollo y crecimiento de las mismas en condiciones *in vitro* e invernadero.

H₀₂: Las técnicas microbiológicas y moleculares no permiten clasificar taxonómicamente las veinte cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP.

H₀₃: Las cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP no presentan variabilidad genética entre ellas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1 Experimental:

- Cepas de *Azospirillum* spp.
- Cepas de *E. coli* transformadas para clonaje
- Semillas de Maíz de la variedad INIAP – 101.
- Secuencias iniciadoras “primers”
- Enzimas de restricción.

5.1.2 Laboratorio:

- Cajas Petri de plástico y vidrio
- Micro pipetas
- Porta y cubre objetos
- Azas metálicas
- Tubos eppendorf

- Tubos de ensayo tapa rosca (30ml.)
- Fundas plásticas para autoclavar
- Placas PCR

5.1.3 Equipos:

- Cámara de flujo laminar en vertical
- Autoclave eléctrico
- Incubadora
- Termociclador
- Cámaras de electroforesis horizontal
- Foto documentador de geles
- Centrifuga de tubos eppendorf
- Centrifuga de placas PCR
- Secuenciador ABI PRISM 310

5.1.4 Reactivos:

- Alcohol antiséptico 75%
- Alcohol Industrial 95%
- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Sulfato de Magnesio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O)
- Azul de Bromotimol
- Cloruro de Sodio (CaCl₂ 2H₂O)
- Cloruro Férrico (FeCl₃)
- Extracto de levadura
- Bacto Agar
- D-L Ácido Málico
- Hidróxido de Potasio (KOH)
- Acido Clorhídrico al 37%

5.1.5 Invernadero:

- Fundas plásticas
- Medidor digital de Temperatura y Humedad
- Piceta plástica con medición volumétrica
- Palas metálicas

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Características del sitio experimental:

UBICACIÓN POLITICA:

Provincia: Pichincha
 Cantón: Mejía
 Parroquia: Cutuglagua
 Altitud: 3.058m

Fuente: INAMHI, 2005

El estudio se realizará en cuatro fases:

Fase I: Evaluación *in vitro*, se realizará en la Planta piloto del Programa de Maíz.

Fase II: Evaluación en Invernadero, se realizará en los Invernaderos del INIAP.

Fase III: Identificación Fenotípica y Bioquímica, se realizará en la Planta Piloto del Programa de Maíz.

Fase IV: Identificación y Caracterización Molecular, se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología.

5.2.2. FASE I: EVALUACIÓN IN VITRO

5.2.2.1. Factores en Estudio:

El factor en estudio corresponde a las 20 cepas de *Azospirillum* spp. descritas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Banco de cepas de *Azospirillum* spp. con su codificación y procedencia correspondiente^{1/}.

CODIGO	IDENTIFICACIÓN	PROCEDENCIA
C1	<i>Azospirillum</i> spp.*	Bolívar, Chillanes, Pacay
C2	<i>Azospirillum</i> spp.*	Bolívar, Guaranda, Veintimilla, Laguacoto 2
C3	<i>Azospirillum</i> spp.*	Tungurahua, Pillaro, Emilio Terán, El Capulicito
C4	<i>Azospirillum</i> spp.*	Chimborazo, Alausí, Sibambe, Cochapamba
C5	<i>Azospirillum</i> spp.*	Chimborazo, Alausí Tixan, Somisón
C6	<i>Azospirillum</i> spp.*	Tungurahua, Pelileo, Pelileo, El Tambo
C7	<i>Azospirillum</i> spp.*	Tungurahua Quero, Quero, La Concepción
C8	<i>Azospirillum</i> spp.*	Tungurahua, Mocha
C9	<i>Azospirillum</i> spp.*	Tungurahua, Mocha
C10	<i>Azospirillum brasilense</i> sp7	Cuba
C11	No identificada**	Pichincha, Pedro Moncayo
C12	No identificada**	Imbabura, Otavalo, Otavalo
C13	No identificada**	Imbabura, Otavalo
C14	No identificada**	Carchi, Espejo
C15	No identificada**	Carchi, Espejo
C16	No identificada**	Carchi, Espejo, Mira
C17	No identificada**	Imbabura, Antoño Ante
C18	No identificada**	Imbabura, Cotacachi
C19	No identificada**	Imbabura, Otavalo
C20	No identificada**	Pichincha, Quito

^{1/} Espinoza, 2004

*: Las pruebas fenotípicas y bioquímicas realizadas para estas cepas, resultaron positivas para el género *Azospirillum*.

** : No se han realizado pruebas fenotípicas ni bioquímicas para estas cepas.

5.2.2.2. Tratamientos

Los tratamientos están constituidos por los factores en estudio descritos en el Cuadro 1; más un tratamiento que corresponde al Testigo donde no se inoculará ningún microorganismo.

5.2.2.3. Unidad Experimental

La Unidad experimental se considerará a una semilla de maíz pre germinada de la variedad INIAP-101, en su respectiva caja petri, inoculada con la cepa de *Azospirillum* spp. correspondiente.

5.2.2.4. Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) con siete repeticiones.

5.2.2.5. Análisis Estadístico

Para la evaluación *in vitro* de las 20 cepas de *Azospirillum* spp. más un testigo, se realizará un Análisis de Varianza (ADEVA).

Cuadro 2. Análisis de Varianza ADEVA de las 20 cepas de *Azospirillum* spp.

FUENTE DE VARIACION	GL
Total	146
Tratamiento	20
Error	126

5.2.2.6. Análisis Funcional

Se realizará la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos que presenten significación estadística.

5.2.2.7. Variables y Métodos de Evaluación

Largo de raíz

La longitud de las raíces de las semillas pre germinadas de maíz será medida en centímetros. Estos datos se tomarán después de la inoculación con *Azospirillum* todos los días de duración de la evaluación *in vitro* (3 días). Al final se calculará la tasa relativa de crecimiento por día, para obtener un promedio según el número de repeticiones por tratamiento (INIFAP, 2008).

Peso fresco de raíz

Se registrará el peso fresco de las raíces al final del ensayo *in vitro*. La medida se reportará en gramos.

5.2.3. FASE II: EVALUACIÓN EN INVERNADERO

5.2.3.1. Factores en Estudio:

El factor en estudio corresponde a las diez mejores cepas de *Azospirillum* spp. obtenidas de la evaluación en *in vitro*.

5.2.3.2. Tratamientos

Los tratamientos están constituidos por los factores en estudio; más un tratamiento que corresponde al testigo donde no se inoculará ningún microorganismo.

5.2.3.3. Unidad Experimental

La Unidad experimental se considerará a una planta de maíz de la variedad INIAP-101, en su respectiva funda con 500 g de sustrato estéril, inoculada con la cepa de *Azospirillum* spp. correspondiente.

5.2.3.4. Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) con seis repeticiones.

5.2.3.5. Análisis Estadístico

Para la evaluación en invernadero de las diez mejores cepas de *Azospirillum* spp. más un testigo, se realizará un Análisis de Varianza (ADEVA).

Cuadro 3. Análisis de Varianza ADEVA de las 10 cepas evaluadas de *Azospirillum* spp.

FUENTE DE VARIACION	GL
Total	65
Tratamiento	10
Error	55

5.2.3.6. Análisis Funcional

Se realizará la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos que presenten significación estadística.

5.2.3.7. Variables y Métodos de Evaluación

Análisis de nitrógeno en sustrato

Previo a la siembra de las plantas de maíz en invernadero se realizará el análisis de nitrógeno (total y disponible) del sustrato a usar, mediante la metodología del análisis químico de suelos establecida en el laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA) del INIAP (Alvarado *et al.*, 2000).

Longitud de planta

La longitud de la planta será medida en centímetros desde la base del sustrato hasta el ápice de la hoja bandera. Este dato se tomará a partir del momento de la inoculación cada tres días durante las seis semanas de permanencia del ensayo en invernadero (INIFAP, 2008).

Longitud de raíces

La longitud de raíz será medida en centímetros desde el cuello hasta el extremo más distante de la raíz. Estos datos se tomarán al final de las seis semanas del ensayo en invernadero (Espinoza, 2004).

Peso fresco de planta

El peso fresco de la parte aérea de las plantas de maíz así como de las raíces será registrado en gramos. Estos datos se tomarán al final de las seis semanas de duración del ensayo en invernadero (Espinoza, 2004).

Peso seco de planta

El peso seco de la parte aérea de las plantas de maíz; así como de las raíces será registrado en gramos. El material vegetal se secará a 60 °C durante 24 h. Estos datos se tomarán al final de las seis semanas de duración del ensayo en invernadero (Espinoza, 2004).

Extracción de nitrógeno foliar

En el material vegetal que se utilizó para la determinación de peso seco de planta se determinará el contenido de nitrógeno total; mediante la metodología Semi-Micro-Kjeldahl, vigente en el laboratorio del DMSA (Alvarado *et al.*, 2000). Con los resultados obtenidos de concentración de nitrógeno y rendimiento de materia seca de la planta; se calculará la extracción de nitrógeno, la cual se expresarán en kg/ha.

Población de *Azospirillum* spp.

Mediante análisis microbiológico de raíz después de las seis semanas de ser mantenida en invernadero, se evaluará la población de *Azospirillum* spp. de tres unidades experimentales en medio NFB (Nitrogen Fixation Biological) semi-sólido (Anexo 1) (Espinoza, 2004). Los resultados se expresarán en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de raíz (UFC/g de raíz), según el método estimativo del número más probable utilizando la tabla de Mc Crady (Anexo 4) (Universidad Complutense, 2001).

5.2.4. FASE III: IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y BIOQUÍMICA

5.2.4.1. Factores en Estudio:

El factor en estudio corresponde a las 20 cepas de *Azospirillum* spp. descritas en el Cuadro 1

5.2.4.2. Tratamientos

Los tratamientos están constituidos por los factores en estudio descritos en el Cuadro 1 a los cuales se les realizará las pruebas fenotípicas y bioquímicas correspondientes (Anexo 2).

5.2.4.3 Unidad Experimental

La Unidad experimental corresponde a una Caja petri que contiene cada una de las 20 cepas de *Azospirillum* spp. completamente puras y sembradas en medio de cultivo específico.

5.2.5. FASE III: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

5.2.5.1. Factores en Estudio:

El factor en estudio corresponde a las 20 cepas de *Azospirillum* spp. descritas en el Cuadro 1

5.2.5.2. Tratamientos:

Los tratamientos están constituidos por los factores en estudio descritos en el Cuadro 1 a los cuales se les realizará las pruebas moleculares correspondientes.

5.2.5.3. Unidad Experimental

La Unidad experimental corresponde a una Caja Petri que contiene cada una de las 20 cepas de *Azospirillum* spp. completamente puras y sembradas en su medio de cultivo correspondiente.

5.2.5.4. Análisis de Distancia Genéticas

Las imágenes digitalizadas de los geles producto del Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) serán analizadas con el software Quantity One de Biorad (Jiménez, 2007). Se establecerán los patrones de bandas en cada cepa aislada mediante una matriz básica de presencia y ausencia (1 y 0); los pesos moleculares de cada banda se determinan mediante un análisis de regresión lineal, teniendo como referencia los pesos moleculares del marcador de talla 100 pb ADN Ladder marca Invitrogen catálogo N° 10488-058. Posteriormente, se construirá una matriz de similaridad genética utilizando el índice de DICE y Jaccard, incluidos en el software, a partir de los cuales se realizará el análisis de agrupamiento UPGMA (*Método del grupo del par de Unweighted con medio aritmético*) y el correspondiente dendrograma para cada enzima. Adicionalmente, se utilizará el programa informático NTSYS versión 2.1 que permite un análisis de similitud y el respectivo análisis de agrupamiento UPGMA (Jiménez, 2007).

5.3. MANEJO ESPECÍFICO

5.3.1. FASE I: EVALUACIÓN IN VITRO

5.3.1.1. Reactivación

a) Reactivación del Banco de Cepas de Azospirillum spp. en medios de cultivo específicos

La reactivación consiste en pasar las cepas del estado de liofilización a medios de cultivo específicos para obtener un monocultivo puro de cada cepa de *Azospirillum*; para lo cual, se colocará 1ml de peptona al 0,1% (Anexo1) en los tubos eppendorf que contienen las cepas liofilizadas; seguido se someterán a agitación con ayuda de un vórtex hasta homogenizar la mezcla, de ésta se tomará 50 µl y se colocará en cajas petri con medio Acido Málico – Rojo Congo sólido y con un triángulo de vidrio estéril se dispersará la mezcla en toda la superficie del medio; la caja petri se sellará y colocará en una incubadora a temperatura de 30°C por 7 días; una vez transcurrido el tiempo se observarán varias colonias de *Azospirillum* spp. las cuales se purificarán tomando las colonias más puras y sembrándolas mediante estriado compuesto en medio Acido Málico- Rojo Congo, este tipo de siembra se repetirá hasta obtener un monocultivo puro de cada cepa. (Girard y Rougieux, 1964).

b) Reactivación en planta del Banco de Cepas de Azospirillum spp.

Una vez obtenidas las cepas puras se procederá a inocularlas en plantas de maíz con el fin de: reactivarlas volviendo a las condiciones originales de la bacteria y evaluar su viabilidad, debido a que estas estuvieron sometidas al estado de liofilización durante un período de seis años; por lo tanto, se realizará la evaluación de viabilidad para asegurar la conservación adecuada del material biológico con el que se cuenta.

Las plantas de maíz se inocularán con 5 ml de caldo nutritivo fermentado (Díaz *et al.*, 2001) conteniendo cada cepa por separado, de concentración 10^7 bacterias/ml (Fallik *et al.*, 1988), excepto las plantas testigo que se inoculará con caldo nutritivo sin ningún microorganismo. Las plantas se mantendrán en el invernadero durante 30 días a partir de la inoculación, a una temperatura promedio de 23 °C y 49 % de humedad. El riego será con agua destilada estéril dos veces a la semana, según los requerimientos de las plantas. Después de los 30 días las plantas serán procesadas y la bacteria será aislada de la raíz. Para conocer la concentración de *Azospirillum* spp. por gramo de raíz se calculará el número más probable (NMP) (García, 2003), según la tabla de Mc Crady (Anexo 4). Para verificar que las cepas aisladas corresponden al género en estudio, se las estriará en cajas Petri con medio Acido Máfico-Rojo Congo (Anexo 1), ya que las colonias de *Azospirillum* en este medio deben tornarse de color rojo oscuro o rojo escarlata intenso (Rodríguez y Cáceres, 1982).

5.3.1.2. Evaluación

a) *Desinfección de semillas de Maíz variedad INIAP 101 y pre-germinación:*

Las semillas de la variedad de maíz INIAP-101 se desinfectarán con la siguiente metodología: se sumergirán las semillas en alcohol industrial durante 1 minuto, transcurrido el tiempo se escurrirá el alcohol y se añadirá una solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico (Anexo 3) dejándolo actuar durante 1 minuto; finalmente se harán 4 lavados con agua destilada estéril para luego colocar las semillas sobre papel toalla estéril. Se colocarán de 7 semillas desinfectadas por caja Petri con agua estéril. Para promover la germinación se incubarán las semillas a 25°C durante 3 días (Espinoza, 2004). Para esta fase se usarán plántulas que presenten una radícula de longitud de 1cm aproximadamente (INIFAP, 2008).

b) *Cultivo de aislados bacterianos:*

Con ayuda de un asa de platino se inoculará cada cepa en un tubo con medio de caldo nutritivo estéril (Anexo 1). Los tubos inoculados se incubarán a 30°C en agitación constante por 24 horas antes de ser empleados (Espinoza, 2004).

c) *Evaluación del efecto de las bacterias sobre el crecimiento de maíz.*

Una vez que las semillas germinadas presenten una longitud de raíz de aproximadamente 1 cm, se elegirán las siete plántulas más similares en desarrollo y se colocarán en una caja petri la cual contiene agar-agua (9 g agar/l agua). Para posteriormente inocular 100 µl de cada cultivo bacteriano sobre cada raíz con la ayuda de una micropipeta automática. Cada serie de evaluaciones requiere de un control, así que éste se obtendrá aplicando 100 µl del medio de cultivo sin crecimiento bacteriano. Estas cajas inoculadas se colocarán a 28°C en una incubadora. A los siete días después de la inoculación se realizarán las evaluaciones de crecimiento midiendo la longitud final de las raíces y calculando la tasa relativa de crecimiento por día, obteniendo un promedio según el número de repeticiones por tratamiento (INIFAP, 2008). Con este ensayo se seleccionará las 10 mejores cepas cuyo estímulo de crecimiento sea mayor en maíz para llevar a cabo la siguiente fase de evaluación en invernadero.

5.3.2. FASE II: EVALUACIÓN EN INVERNADERO

5.3.2.1. Preparación del sustrato

Se utilizará un sustrato preparado con tierra negra, humus, pomina, ecoabonaza y sustrato con vermiculita en proporciones 2:1:0,25:0,25:0,25. Se colocarán 2.25 kg de este sustrato en fundas plásticas de polifán y se sellarán al calor para posteriormente esterilizar en autoclave a 121 °C durante 3 horas distribuidos a una hora por día (Espinoza, 2004).

5.3.2.2. Análisis físico - químico del sustrato

Se realizará el análisis físico - químico del sustrato, para la determinación de macro y micronutrientes, conductividad eléctrica, pH, capacidad de intercambio catiónico y textura. Todos los análisis serán realizados por el DMSA (Alvarado *et al.* 2000).

5.3.2.3. Desinfección de semillas de Maíz variedad INIAP 101 y pre-germinación

Las semillas de la variedad de maíz INIAP-101 se desinfectarán con la siguiente metodología: se sumergirán las semillas en alcohol industrial durante 1 minuto, transcurrido el tiempo se escurrirá el alcohol y se añadirá una solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico (Anexo 3) dejándolo actuar durante 1 minuto; finalmente se harán 4 lavados con agua destilada estéril para luego colocar las semillas sobre papel toalla estéril. Se colocarán de 7 semillas desinfectadas por caja Petri con agua estéril. Para promover la germinación se incubarán las semillas a 25°C durante 3 días (Espinoza, 2004).

5.3.2.4. Siembra en invernadero de semillas pre germinadas de Maíz de la Variedad INIAP 101:

En funda negras de polipropileno se colocará 500g. de sustrato estéril y dos semillas pre germinadas. se regarán con agua destilada estéril. Después de 9 días se dejará una planta por funda. Las condiciones ambientales para las plantas en Invernadero serán de: 23°C y 49% Humedad en promedio (Espinoza, 2004).

5.3.2.5. Preparación de suspensión bacteriana:

Para evaluar en invernadero el efecto de las cepas en el crecimiento del maíz de la variedad INIAP 101, se preparará una suspensión bacteriana con cada cepa. De las cajas con medio ácido málico-rojo Congo se inoculará una muestra bacteriana abundante con ayuda de un asa de platino en un matraz de 100 ml conteniendo 50 ml de caldo nutritivo. Cada cepa se propagará en agitación rotatoria a 120 rpm a 19°C durante 20-24 horas, hasta obtener una suspensión bacteriana de ligera turbidez (Fallick *et al.*, 1988). En un espectrofotómetro se medirá la densidad celular del cultivo, para lo cual con una micropipeta se tomará 10 ml de la suspensión bacteriana y se colocará en un tubo de ensayo estéril. La muestra se someterá a 540 nm y al obtenerse un valor de 1 en absorbancia indicará que ésta contiene aproximadamente 1×10^9 UFC/ml según lo descrito por Bashan (1997); posteriormente se colocará 1ml de ésta suspensión a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina al 0.85%, para obtener la dilución 1×10^8 UFC/ml, este proceso se repetirá hasta obtener una concentración bacteriana de 1×10^7 UFC/ml el cual será el inoculante líquido para las plantas de maíz (Fallick *et al.*, 1988).

5.3.2.6. Inoculación de las cepas de Azospirillum spp. en plantas de Maíz:

Las plantas se inocularán con 5 ml de caldo fermentado (Díaz *et al.*, 1998) conteniendo cada cepa por separado, de concentración 10^7 bacterias/ml (Fallik *et al.*, 1988), excepto las plantas testigo que se inoculará con caldo nutritivo sin ninguna bacteria. Las plantas se mantendrán en el invernadero durante

seis semanas a partir de la inoculación, a una temperatura promedio de 23 °C y 49 % de humedad. El riego será con agua destilada estéril dos veces a la semana, según los requerimientos de las plantas. Transcurrido el tiempo del ensayo las plantas serán procesadas para evaluar las variables: altura de planta, peso de materia fresca, peso de materia seca y extracción de nitrógeno para de esta manera evaluar las cepas más efectivas como estimuladoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el maíz de altura (Espinoza, 2004).

5.3.2.7. *Procesamiento de plantas para el Aislamiento de Azospirillum a partir de Raíces de Maíz*

Trascurrido el tiempo de evaluación de crecimiento del Maíz con las bacterias inoculadas, se procederá a separar pedazos de raíz de cada muestra de funda con sustrato, y se colocará en un tamiz de 2 mm para lavarlos en agua corriente durante 5-10 minutos. Los pedazos de raíz se colocarán sobre papel toalla y se dejará secar a temperatura ambiente durante 24 horas para posteriormente pesar 1 gramo de raíz y colocarlo en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril (dilución 10^{-1}). El tubo con la dilución 10^{-1} se someterá a un agitador vortex, posteriormente se tomará del tubo 1 ml para depositarlo en otro tubo con 9 ml de agua destilada estéril (10^{-2}). Repitiendo este procedimiento se prepararán las diluciones seriadas hasta 10^{-10} . En otros tubos de ensayo de 10 ml, se colocará 6 ml de medio específico semisólido, libre de nitrógeno NFB (nitrogen fixation biological) (Anexo 1). Se prepararán 3 tubos por cada dilución. En cada tubo con medio NFB se depositará 0.3 ml de la dilución. Los tubos inoculados se colocarán a incubación durante 14 días a 30°C. Después de la incubación se considerarán como tubos con crecimiento bacteriano positivo aquellos cuyo medio de cultivo se tornará azul y que presenten una leve película blanquecina a 2-3 mm por debajo de la superficie del medio de cultivo (Espinoza, 2004).

Para conocer la concentración de *Azospirillum* spp., por gramo de raíz se calculará el número más probable (NMP) (García, 2003), según la tabla de Mc Crady (Anexo 4). Para verificar que las cepas aisladas corresponden al género en estudio, se las estrió en cajas Petri con medio Acido Máfico-Rojo Congo (Anexo1), ya que las colonias de *Azospirillum* en este medio deben tornarse de color rojo oscuro o rojo escarlata intenso (Rodríguez y Cáceres, 1982).

5.3.3. FASE III: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

5.3.3.1. Pruebas Fenotípicas y Bioquímicas

Pruebas Fenotípicas

Se evaluarán colonias bien diferenciadas y puras de cada cepa aislada de invernadero, sembradas en el medio de enriquecimiento NFB sólido. Las características coloniales a valorar son: diámetro, forma, elevación, borde, color, superficie, cambio de color en el medio y consistencia de las colonias (Anexo 2) (Espinoza, 2004).

Pruebas Bioquímicas

Se evaluarán las colonias bien diferenciadas y puras, sembradas en medio de cultivo solido Agar Nutriente (Anexo 1). La pruebas a realizarse son: Tinción Gram, Forma Celular, Catalasa, Oxidasa, Ureasa, Prueba de motilidad, Prueba del Poli β -Hidroxibutirato, Reducción de Nitratos y Prueba del Indol (Anexo 2) (Prescott, 2004).

5.3.4. FASE IV: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

5.3.4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de todos los ejemplares del banco de cepas se realizará empleando el protocolo de “Extracción de ADN de bacterias y Hongos” (Weising *et al.*, 1995), modificado por el CIP-Quito (Anexo 5)

5.3.4.2. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizará mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v), aplicando el marcador de talla y peso Low ADN Mass Ladder marca Invitrogen Catálogo N°10068-013 para compararlo con las muestras de ADN. Las condiciones de la corrida electroforética serán de un voltaje de 100v en un tiempo de 30-35 min. Posteriormente se realizará la tinción de los geles en una solución Bromuro de Etidio a una concentración de 15 ppm por un periodo de tiempo de 15-20 min en leve agitación continua. Los geles se visualizarán en el fotodocumentador Dolphin View Wealtec. También se realizará la cuantificación por fluorometría utilizando el equipo denominado QUBIT™ (Anexo 6) para posteriormente diluir los ADN obtenidos a una concentración determinada y prepararlos para el método de amplificación por PCR (Morillo y Miño, 2010).

5.3.4.3. ARDRA: Análisis de Restricción del ADN ribosomal 16S Amplificado

5.3.4.3.1. Amplificación del 16Sr

La concentración de ADN se ajustará a 5 ng/μl. La amplificación del gen 16S se realizará utilizando los primers universales reportados para eubacterias: 27f y 1495R (Cuadro 3) que amplifican la región correspondiente a 1500 pares de bases del gen 16S. La reacción de amplificación se realizará en el equipo Termociclador Biometra T Gradient, preparando la solución Master Mix que contará con: 1x Buffer de PCR (Invitrogen), 1,8 mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,8 pmol/ul por cada primer y 0,06 U GoTaq (Invitrogen), incluyéndose como coadyuvante en la reacción al suero de albúmina bovina (BSA) a 1mg/ml de concentración final. El programa de amplificación consistirá en una denaturación inicial de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 54°C y 1 minuto a 70°C, seguidos por una extensión final de 8 minutos a 70°C (Benítez y McSpadden Gardener, 2009).

Cuadro 3. Secuencia y número de pares de bases de los iniciadores universales utilizados para la amplificación del DNAr 16s de bacterias.

INICIADOR	SECUENCIA	PARES DE BASES
27f	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'	20
1495r	5'- CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA -3'	20

Los productos de PCR serán visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% y posteriormente se realizará la tinción de los mismos en una solución de Bromuro de Etidio a 15 ppm por un periodo de tiempo de 15-20 min. a agitación continua. Los geles se visualizarán en el fotodocumentador Dolphin View Wealtec.

5.3.4.3.2. Restricción Enzimática Virtual

Con el fin de verificar el nivel de polimorfismo generado por las enzimas de restricción (en proceso de definición) para emplear en la técnica ARDRA se realizará una restricción enzimática virtual de la secuencia del amplicon utilizando el programa CLC Gene Workbench 2.2.4® (Junior *et al.*, 2004). Para eso se extraerán del Genbank, secuencias tipo del ADNr 16S de las especies de bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense* y *A. largomobile*). Estas secuencias serán sometidas a un corte virtual con las enzimas disponibles en el programa en la opción: “Enzyme restriction bank” (Junior *et al.*, 2004). Se escogerán las enzimas que brinden: patrones de bandas diferentes para cada especie, que generen un número considerable de fragmentos y que estos se encuentren a distancias distinguibles en los geles de agarosa asegurando con esto procesar de manera eficaz y confiable la información generada por las enzimas. Posteriormente estos resultados virtuales ayudarán para la selección y compra de las enzimas, además que deberán estar complementados con bibliografía y posteriormente serán comparados con los patrones electroforéticos obtenidos en la práctica.

5.3.4.3.3. Digestión del fragmento de ADNr 16S con Enzimas de Restricción

Los fragmentos de 1500 pb, productos de la amplificación, serán digeridos con dos enzimas de restricción seleccionadas con el programa virtual (*Alu I* y *Taq I*). Las digestiones se llevarán a cabo por separado con cada enzima en un volumen final de 10ul que contiene: 10U de cada una de las enzimas por μ l; Buffer 10X; 0.1mg/ul de albúmina de suero bovina (BSA); 4ul de producto de amplificación. Todas las digestiones serán realizadas en el termociclador PTC 100 programable a una temperatura de incubación de 37°C por 1-4 horas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante o proveedor de las enzimas. Culminado el tiempo de incubación se hará un tratamiento de desactivación de la enzima elevando la temperatura a 75-80°C por un periodo de 20 min, esto ayudará para detener la reacción y evitar la acción de las ADNasas (Junior *et al.*, 2004).

5.3.4.3.4. Perfil electroforético para el ARDRA

Para observar y separar los productos de la restricción enzimática del ADNr 16S se correrá una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.5% (p/v). Se colocará en cada pozo del gel 25ul del producto de amplificación con 5ul de buffer de carga blue juice 1X (Junior *et al.*, 2004). Se utilizará el marcador de talla y peso de 100bp Ladder marca Invitrogen catálogo N° 10488-058. La electroforesis se llevará a cabo durante 1-2 horas a un voltaje de 50v. Posteriormente se realizará la tinción de los geles en una solución de Bromuro de Etidio para visualizar las bandas en el fotodocumentador Dolphin View Wealtec.

5.3.4.3.5. Análisis de Distancias Genéticas

Las imágenes digitalizadas de los geles producto del Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) serán analizadas con el software Quantity One de Biorad (Jiménez, 2007). Se establecerán los patrones de bandas en cada cepa aislada mediante una matriz básica de presencia y ausencia (1 y 0); los pesos moleculares de cada banda se determinan mediante un análisis de regresión lineal, teniendo como referencia los pesos moleculares del marcador de talla 100 pb ADN Ladder marca Invitrogen catálogo N° 10488-058. Posteriormente, se construirá una matriz de similaridad genética utilizando el índice de DICE y Jaccard, incluidos en el software, a partir de los cuales se realizará el análisis de agrupamiento UPGMA (*Método del grupo del par de Unweighted con medio aritmético*) y el correspondiente dendrograma para cada enzima. Adicionalmente utilizando el programa informático NTSYS versión 2.1 que permite un análisis de similitud y el respectivo análisis de agrupamiento UPGMA (Jiménez, 2007).

5.3.4.4. Secuenciación del ADNr 16S

5.3.4.4.1. Amplificación y Purificación del ADNr 16S

De cada grupo obtenido con las enzimas de restricción se tomará un aislamiento representativo, que serán aquellas 5 cepas que dieron los mejores resultados al evaluarlas en invernadero, para la secuenciación del ADNr 16S. Seleccionado los ejemplares se realizará la amplificación de dicho ADN mediante la técnica de PCR en las condiciones descritas anteriormente. A los productos amplificados se les realizará una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (p/v). Para observar las bandas se hará la tinción de los geles en una solución Bromuro de Etidio a una concentración de 15 ppm por un periodo de tiempo de 15-20 min. Los geles se visualizarán en el fotodocumentador Dolphin View Wealtec. Si no se observa una sola banda clara y definida en el tamaño esperado de aproximadamente 1500pb, se realizará una purificación del producto de PCR utilizando el kit de purificación PCR Purification Kit cat. No. K3100-01 de Invitrogen.

5.3.4.4.2. Restricción enzimática del amplificado de ADNr 16S

El ADNr 16S amplificado y purificado será sometido a una digestión enzimática con *EcoR* I, la cual cortará la secuencia una sola vez, para obtener como resultado dos segmentos de diferente peso molecular del amplicón del ADNr. Esto se realizará con el objetivo de obtener dos segmentos del gen de tamaños menores a 900 pb, debido a la capacidad que posee el secuenciador ABI PRISM 310 que dispone el Laboratorio de Biotecnología.

5.3.4.4.3. Clonaje

Una vez obtenido el corte del gen con la enzima de restricción, los segmentos serán sometidos a la técnica de clonaje con la aplicación del kit TOPO TA Cloning ® cat. N° K4520-01, el cual dará como resultado colonias bacterianas de *E. coli* transformadas de color blancas y no transformadas de color azul, las colonias blancas corresponden a bacterias que contienen el inserto clonado. Para comprobar si la colonia bacteriana posee el inserto se realizará una amplificación con PCR, si efectivamente poseen el inserto dará como resultado fragmentos del tamaño esperado. Se verificará las amplificaciones en geles de agarosa al 2%. Una vez comprobado que poseen el inserto se concentrará el ADN de las bacterias transformadas aplicando el kit Pure link Quick Plásmid Miniprep Kit cat. N°K2100-10, para así tener el fragmento de interés y secuenciarlo (Morillo y Miño. 2010).

5.3.4.4.4. Secuenciación

Las muestras obtenidas serán secuenciadas usando el kit BIG DYE TERMINATOR v3.1 Cycle Sequencing Kit marca Applied Biosystems, y serán corridas en el secuenciador ABI PRISM 310. Obtenida la información genética requerida las secuencias de las muestras analizadas serán alineadas y comparadas con las secuencias tipo 16S ribosomal tomadas del RDBP (Ribosomal Data Base Project) donde se analizarán las similitudes a cada especie (Jiménez, 2007). Posteriormente se realizará el dendrograma correspondiente para el Género *Azospirillum* en el cual se analizará las distancias genéticas de las muestra para ser asignadas al grupo taxonómico correspondiente.

5.3.4.5. Caracterización Molecular

5.3.4.5.1 Variabilidad genética con el empleo de RAPDs

El ADN genómico de cada cepa se someterá a una reacción de amplificación con marcadores RAPDs no específicos, para lo cual se utilizará el siguiente coctel de reacción (Morillo y Miño, 2010):

Componentes	1 Rx
ADN (5 ng / μ l)	1,5 μ l
5X buffer 1/	2,2 μ l
Primer RAPD (1,0 μ M)	0,4 μ l
dNTPs (2,5 mM)	0,4 μ l
Taq polimerasa (5U/ μ l)	0,13 μ l
H2O ultra pura	2,3 μ l
	<hr/>
Volumen final	6,9 μ l

^{1/} Buffer 5X: 50 mM Tris (pH 8,5); 10 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 500 mg/ μ l de BSA; 0,01% Xilene cyanole, 1,5% Ficol 400. RAPDS

La reacción será cubierta con una gota de aceite mineral (para evitar la evaporación de los componentes) y amplificada en un termociclador, PTC 100 con el siguiente programa:

Paso	Temperatura	° C	Tiempo
1	Denaturación inicial	94	5 min.
2	Denaturación cíclica	94	30 seg.
3	Anillamiento	42	1 min.
4	Elongación	72	2 min.
	40 veces el paso 2 hasta el paso 4		
6	Elongación final	72	7 min.
7	Conservación de la muestra	4	5 min.

Los productos de amplificación se analizarán por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X con tinción en bromuro de etidio a una concentración de 15 ppm. La electroforesis se realizará por 1 hora a 100 V. Se utilizará el marcador de talla y peso de 100bp Ladder marca Invitrogen catálogo N° 10488-058. Para la visualización de las bandas se colocará el gel bajo un transiluminador UV y se imprimió la imagen en papel térmico para su evaluación posterior.

6. CRONOGRAMA

#	ACTIVIDADES	MESES													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	Capacitación en los Laboratorios de Biología Molecular	■	■												
2	Capacitación en la Planta Piloto del Programa de Maíz		■	■	■										
3	Investigación Bibliográfica		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	Redacción y Presentación del Anteproyecto				■	■									
5	Reactivación y Purificación de las Cepas de <i>Azospirillum</i> spp.				■	■									
6	Desinfección y Germinación de semillas de maíz INIAP 101						■								
7	Siembra de las semillas de maíz INIAP 101 <i>in vitro</i> e inoculación de las cepas de <i>Azospirillum</i> spp.						■								
8	Evaluación del efecto de <i>Azospirillum</i> spp sobre las semillas de Maíz.						■	■							
9	Siembra de las semillas de maíz INIAP 101 en invernadero e inoculación de las cepas de <i>Azospirillum</i> spp.							■							
9	Evaluación del efecto de <i>Azospirillum</i> spp sobre las plantas de Maíz.							■	■						
10	Aislamiento de <i>Azospirillum</i> a partir de raíces de maíz								■						
11	Purificación de las cepas de <i>Azospirillum</i> spp.								■						
12	Realización de pruebas fenotípicas y bioquímicas a las cepas de <i>Azospirillum</i> spp.								■	■					
13	Identificación y caracterización molecular de las cepas de <i>Azospirillum</i> spp.									■	■	■	■	■	■
14	Redacción del Documento.								■	■	■	■	■	■	■
15	Presentación de Informe Final														■

7. PRESUPUESTO

RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	UNITARIO (USD)	TOTAL
MATERIALES DE LABORATORIO				
Cajas Petri de Plástico	Cajas	3	3.50	10.50
Fundas de polipropileno	Paquetes de 50u	4	0.50	2.00
Guantes Quirúrgicos	Caja de 100	1	5.00	5.00
Algodón hidrofílico	Paquete de 500g	1	5.00	5.00
Papel toalla	Rollo	10	2.00	20.00
Parafilm	Rollo	1	10.00	10.00
Palillos de Madera estilo BBQ	Paquetes de 5cjs	1	6.50	6.50
Tubos de ensayo tapa a presión (15cm Lx 2cm A y 30 ml de capacidad volumétrica)	Unidad	600	0.82	492.00
Cajas de puntas para micro pipetas de 1ml	Cajas	5	5.00	25.00
Caja de puntas para micro pipeta de 0,1 ml Eppendorfs	Cajas	5	5.00	25.00
Vasos de precipitación 1000ml	Paquetes de 100 u	3	7.20	21.60
Vasos de precipitación 250 ml	Unidad	5	5.80	29.00
Botellas tapa Azul pírex de 1000 ml	Unidad	5	2.30	11.45
Porta Objetos y cubre Objetos	Unidad	5	6.30	31.50
Gradillas para microtubos de 2ml	Caja de 100u	2	15.0	30.00
Gradillas plásticas para tubos de ensayos	Paquetes de 5u.	2	76.6	155.2
Lámparas de alcohol de vidrio para 100 ml	Unidades	10	8.99	89.90
	Unidades	3	3.39	10.17
SUBTOTAL				\$ 979.82
REACTIVOS				
D-L Acido Málico	Frasco 500g	1	240.00	240.00
Cloroformo	Frasco de 5lt	1	35	35.00
Extracto de Levadura	Frasco 500g	1	160.00	160.00
Bacto Agar	Frasco 500g	1	320.00	320.00
Alcohol Potable 95%	Galón	10	8.50	85.00
Alcohol Antiséptico 70%	Galón	10	3.00	30.00
Discos para Test de Oxidasa	Cajas de 50discos	5	15	75.00
Urea Agar Base (Christensen)	Frasco de 500g	1	102.00	102.00
Sudan Black B (Negro Sudan B)	Frascos de 25g	1	45.00	45.00
SIM Medio o SIM Medium	Frascos de 500g	1	127.00	127.00
Nitrate Broth / Caldo Nitrato	Frascos de 500g.	1	127.00	127.00
Acido Sulfanílico / Sulfanilic Acid	Frasco de 25g	1	38.00	38.00
Naphtol / Naftol	Frasco de 100g.	1	25.00	25.00
Zinc en polvo	Frasco de 10g	1	23.00	23.00
Nessler's Reagent solución	Frasco de 100ml	1	81.00	81.00
Reactivo Lugol	Frasco de 1lt	1	81.00	81.00
Solución Cristal Violeta	Frasco de 1lt	1	131.40	131.40
SUBTOTAL				\$ 1725.4
MATERIAL BIOLÓGICO				
Semillas	Kg	1	2.50	2.50
Sustrato	Quintal	2	8.00	16.00
SUBTOTAL				\$18,50
ANÁLISIS				
Sustrato	Unidades	1	17.08	17.08
Análisis foliar	Unidades	64	8.93	571.52
SUBTOTAL				588,60
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR				
Reactivos				
Síntesis de Primers	Síntesis	2	20	40.00
Taq Polimerasa	Unidad	1	535.50	535.50
Dntps-INVITROGEN	Paquete de 4u.	1	335	335.00
Enzimas de restricción	Unidades de 2500	2	40	80.00
Servicios				
Extracción de ADN	50 muestras	50 muestras	30	30.00
Cuantificación de ADN en Bromuro de Et	50 muestras	50 muestras	30	30.00
Amplificación mediante PCR	48 Rx	48 Rx	96	96.00
Visualización del Producto amplificado	50 muestras	50 muestras	34	34.00
Secuenciación ABI PRISM -310	24 Muestras	24 muestras	584	584.00

Estandarización de secuenciación	24 Muestras	24 Muestras	150	150,00
Digestión enzimática	48 Rx	48rx	96	96,00
Visualización de los productos digeridos	50 muestras	50 muestras	34	34,00
Amplificación marcadores RAPDS	96rx	20muestras	1.44	432,00
Visualización Marcadores RAPDS	1-50 muestras	----	34	238,00
Screening primers con 50 primers	1-50 muestras	----	----	400,00
SUBTOTAL				\$ 3114,5
ELABORACION DEL DOCUMENTO Y SUELDOS				
Fotocopias, impresión y otros	Resmas de papel	5	6.50	32,50
Empastados	Unidad	5	25.25	126.25
Sueldo Becario	1 mes	12 meses	323.85	3886.2
SUBTOTAL				\$ 4044.95
TOTAL		\$ 10471,77		

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ALVARADO, S; CORDOVA, J; LOPEZ, M. 2000. Metodología de análisis físico químico de suelos, aguas y foliares. Tercera aproximación. Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito- Ecuador. 30 p.
2. BASHAN, Y. 1997. Aplicaciones Biotecnológicas en Ecología Microbiana. Cundinamarca, CO. Pontificia Universidad Javeriana – Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. 45 p.
3. BENITEZ, M; McSPADDEN - GARDENER, B. 2009. Linking Sequence to Function in Soil: Sequence directed isolation of novel bacteria contributing to soil borne plant disease suppression. *Applied and Environmental microbiology*. 75: 915-924.
4. CABALLERO - MELLADO, J. 2001. El género *Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. UNAM. México. 22 p.
5. CIAT. 1988. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Simbiosis leguminosa-*Rhizobium*. Proyecto Especial CIAT- UNDP. Capítulo 11. p. 36-42.
6. COLLADOS, C. 2006. Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz. Tesis doctoral. Granada. Universidad de Granada. Departamento de microbiología. 162 p.
7. COOL, A. 2010. Evaluación del biofertilizante a base de cepas de *Azospirillum* spp. en el cultivo de maíz (*Zea mays* L) variedad INIAP-101, en complemento con tres tipos de fertilización, en el sector Aínche, provincia de Chimborazo. Tesis Ingeniero Agrónomo. Guaranda-Ecuador. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica. 104 p.
8. DIAZ - VARGAS, P; FERRERA-CERRANO, J; ALMARAZ SUAREZ, J; ALCÁNTAR, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19. 327-335.
9. DÖBEREINER, J; MARRIEL, I; NERY M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum*. *Microbiology* 22: 1464-1473.
10. DÖBEREINER, J. 1978. Influence of environmental factor on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots: in environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and a symbiotic bacterium. *Educ. Ecol. Bull.* 26 : 343-352.
11. ESPINOZA, L. 2004. Caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp. asociado con el maíz de altura (*Zea mays* L). INIAP. Tesis Licenciatura. Quito-Ecuador. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias de la Educación. Escuela de Biología. 64 p.
12. FALLICK, E; OKON, Y; FISCHER, M. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation. Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and tuning of inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 20: 25 – 49.
13. GAMAZO, C; LOPEZ -GOÑI, I; DIAZ, R. 2005, Manual práctico de Microbiología. 3ra Editorial Masson S.A. Barcelona-España. p. 47-52.

14. GARCÍA, M. 2003. Método del número más probable (NMP). Habana. Instituto de Ecología y Sistemática. Disponible en: www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf
15. GIRARD, H; ROUGIEX, R. 1964. Técnica de Microbiología Agrícola. Zaragoza – España. 244 p.
16. INAMHI, 2005. Anuario Meteorológico. Quito- Ecuador
17. INEC. 2009. Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC. (En línea). Quito - Ecuador. Disponible en: www.ecuadorencifras.com/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html
18. INIAP. 2004. Informe Anual. Programa de Maíz. Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito Ecuador. p. 41-56.
19. INIAP. 2007. Informe Anual. Manejo de Nutrientes por sitio específico con Labranza de Conservación en el Cultivo de Maíz. Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito-Ecuador. p. 10 - 30
20. INIFAP. 2008. Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz temporal. Campo Experimental Bajío. Unidad de Biotecnología. México-Guanajuato. p. 3 – 50.
21. INIFAP. 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Centro de Investigación regional Pacífico Sur. Campo Experimental Rosario Izapa. Folleto Técnico N°5. Tuxtla Chico, Chiapas. México. Disponible en: <http://www.pifsv.org.mx/Boletines/FolletoBiofert.pdf>
22. JIMENEZ, J. 2007. Caracterización Molecular de Cepas Nativas Colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de Restricción del ADN ribosomal 16S. Tesis Microbiólogo Industrial. Bogotá-Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Industrial. 105 p.
23. JUNIOR, F; SILVAM TEIXEIRA, K; URQUIAGA, S; REIS, M. 2004. Identification of *Azospirillum amazonense* isolates associated to *Brachiaria* spp. At different stages and growth conditions and bacterial plant hormone production. Revista Brasileña de Ciencias del suelo Vol. 28. 103-113 p.
24. KIRCHHOF, G.; SCHLOTER, M.; ASSMUSS, B. y HARTMANN, A. 1997. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. Soil Biol. Biochem. 29: 853-862.
25. MORILLO, E; MIÑO, G. 2010. Protocolos de Marcadores Moleculares (compilación). Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). 60 p.
26. OKON, Y; LABANDERA – GONZÁLEZ, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil. Biol. Biochem. 26:1591-1601.
27. PRESCOTT, L. M. 2004. Microbiología. 5ta. Edición. Editor Mc Graw Hill/ Interamericana de España, S.A. España. p. 60-69

28. RAVIKUMAR, S; RAMANATHAN, G; SUBA, N; JEYASEELI, L; SUKUMARAN, M. 2002. Quantification of halophilic *Azospirillum* from mangroves. *Indian J. Mar. Sci.* 31: 157-160.
29. RODICIO, M; MENDOZA, M. 2004. Identificación Bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en Microbiología Clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. 22: 238-245.
30. RODRIGUEZ, E; CÁCERES, A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied Microbiology and Environmental.* 44(2): 940-991
31. SCHROTH, M; HANCOCK, J. 1982. Disease - suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 19. 1376-1381.
32. SPRENT, J; SPRENT, P. 1990. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall, 2 ed. London-England. p. 5- 256
33. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, ES. 2001. Guía de prácticas de microbiología y parasitología ambiental (en línea). Madrid, ES. Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II. Disponible en: <http://www.ucm.es/info/mfar/PDF/Ambiental.pdf>.
34. WEISING, K; NYBOM, K; WOLFF K; MEYER, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. USA. Modificación de Francisco Jarrin, Centro Internacional de la PAPA. INIAP. 320 p.
35. YÁNEZ, C. 2007. Manual de Producción de Maíz para Pequeños Agricultores y Agricultoras. Programa de Maíz. INIAP. Ecuador. p. 2-16.
36. YU, Z; MOHN, W. 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenetic spacer analyses an 16S ribosomal DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1565-1574.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Medios de Cultivo

1. Solución de Peptona 0,1% para Reactivación de cepas liofilizadas (CIAT, 1988).

REACTIVOS	CANTIDAD
Peptona	0,1 g.
Agua destilada	100 ml

2. Acido Málico Rojo Congo solido para el aislamiento y purificación de *Azospirillum* (Rodríguez y Cáceres, 1982).

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua destilada	1000 ml
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.2 g
NaCl	0.1 g
FeCl ₃	0.015 g
D-L. Ácido málico	5.0 g
KOH	4.8 g
Extracto de levadura	0.5 – 1.0 g
Agar	15 g
Solución rojo congo	15 ml
pH 7.0	

Solución Rojo Congo

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua destilada	400 ml
Rojo Congo	1 g

3. Medio semisólido NFB (Nitrogen Free Biological) para *Azospirillum* spp (Döbereiner *et al.*, 1976).

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua destilada	1000 ml
Malato de Sodio	5.0 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
FeCl ₃	0.01 g
Na ₂ Mo O ₄ . 2 H ₂ O	0.002 g
Azul de Bromotimol (0.5% [p/v] C ₂ H ₅ OH solución de KOH)	5 ml
Agar	1.75 g
PH 6.8	

4. Medio de Enriquecimiento para *Azospirillum spp* NFb Sólido (Döbereiner *et al.*, 1976).

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua destilada	100ml
Malato de Calcio (0.5 o 0.25% , p/vol.)	5.0 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
FeCl ₃	0.01 g
Na ₂ Mo O ₄ . 2 H ₂ O	0.002 g
Azul de Bromotimol (0.5% [p/v] C ₂ H ₅ OH solución de KOH)	5 ml
Agar	15 g
pH 6.8	
Extracto de levadura fresca	0,5g.

5. Agar Nutriente (Girard y Rougiex, 1964).

REACTIVOS	CANTIDAD
Extracto de carne	3 g
Peptona Bacteriana	2 g
Agar	15g
Agua destilada	1000 ml
pH	7

6. Caldo Nutritivo (Girard y Rougiex, 1964).

REACTIVOS	CANTIDAD
Extracto de carne	3 g
Peptona Bacteriana	2 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7

ANEXO 2. Identificación Fenotípica y Bioquímica

Pruebas Fenotípicas para *Azospirillum spp.*

Según Dobereiner (1978) y Espinoza (2004) las pruebas fenotípicas de *Azospirillum* se realizan a partir del medio de cultivo NFb solido de 14 días de incubación a 30°C. La morfología a considerar de las colonias son:

- **TAMAÑO:**

Se mide en mm. Pueden ser:

- Pequeñas: ≤ 1 mm.
- Medianas: 1-4 mm.
- Grandes: > 4mm.

- **FORMA:**
Puntiforme, Circular, Filamentosa, Irregular, Rizoides y Fusiforme o alargada (Fig. 1).
- **SUPERFICIE:**
Lisa y brillante; Lisa y mate; Irregular y brillante; Irregular y mate; Filamentoso o cerebroide brillante; Filamentoso o cerebroide mate.
- **ELEVACIÓN:**
Convexa, Elevada, Pulvinada, Umbonada o Plana (Fig. 1).
- **BORDE:**
Entero, Ondulado, Lobulado, Erosionado, Filamentoso o Rizado (Fig. 1).
- **CONSISTENCIA:**
Duras (colonias quebradizas); Cremosas (fácilmente pasa el asa); Viscosa (forma filamentos o mucosidades al tomarlas con el asa)
- **COLOR:** A criterio del observador.

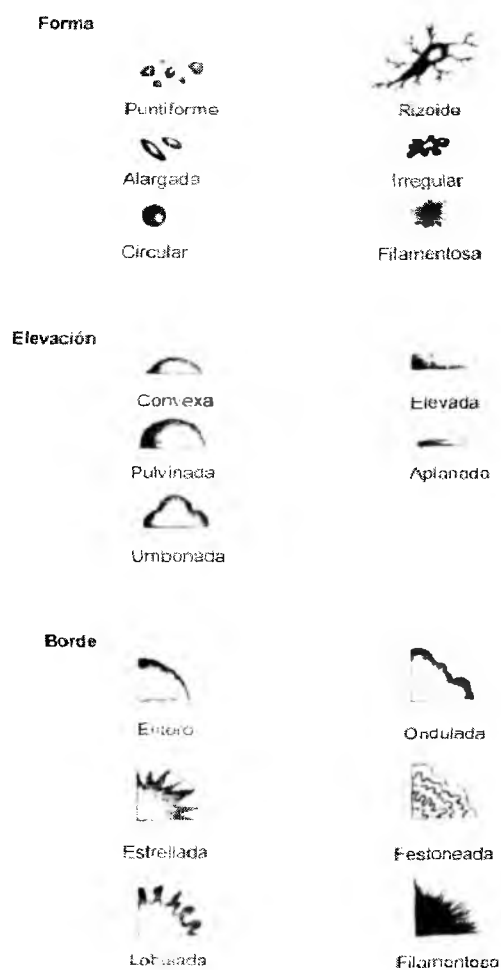


Fig. 1. Morfología colonial en placa.

Pruebas Bioquímicas para *Azospirillum* spp.

I. TINCIÓN GRAM

Es la tinción diferencial más comúnmente empleada en bacteriología. Permite la separación de bacterias en dos grandes grupos: bacterias gram-positivas y gram-negativas, atendiendo a su distinta composición de la pared celular (Espinoza, 2004).

Reactivos

Colorante cristal violeta

Solución A: Cristal violeta, 20g
Etanol (95%), 200ml

Solución B: Oxalato amónico, 8g
Agua destilada, 800ml

Solución de lugol

- Iodo re sublimado, 1g
- IK, 2g
- Agua destilada 300 ml

Solución de safranina

- Solución de safranina en etanol (95%), 10ml
- agua destilada, 90ml

Preparación

Se preparará una extensión de células sobre un porta y se la fijará a la llama de un mechero Bunsen. Se teñirá la extensión con la solución de cristal violeta durante 1-2 minutos, el exceso de colorante se retirará con agua destilada y se aplicará durante 1 minuto la solución de lugol (ésta fija el colorante a la bacteria). Se lavará con agua destilada y se decolorará con alcohol de 96°. Se lavará con agua destilada cuando el alcohol no elimine más colorante y se aplicará el colorante de contraste (safranina) durante 30 segundos. Se lavará con agua destilada, se secará y se observará al microscopio.

Interpretación

Las células a observar han de ser de un cultivo joven ya que la reacción de gram puede variar según envejece un cultivo. Las bacterias gram-positivas aparecen de color violeta, mientras que las gram-negativas se tiñen de rosa (Espinoza, 2004).

II. PRUEBA DE CATALASA

Se basa en la capacidad del enzima catalasa de descomponer el peróxido de hidrógeno añadido, formándose agua y O₂, el cual se libera en forma de burbujas. Excluyendo los estreptococos, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

Reactivos

Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada H₂O₂) al 3%

Procedimiento

- En un porta limpio y seco depositar una colonia bacteriana procedente de un cultivo joven
- Añadir una gota de H₂O₂ al 30% sobre la colonia. sin mezclar. No invertir el orden
- Observar la inmediata formación de burbujas.

Interpretación

Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles.

Prueba negativa: no hay formación de burbujas (Gamazo *et al.*, 2005).

III. PRUEBA DE OXIDASA

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo-oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

Procedimiento

- Tomar con el asa varias colonias de un cultivo puro bacteriano
- Colocar el cultivo en una placa porta objetos y extender las colonias con rayados en círculo
- Poner sobre el rayado un disco para test de oxidasa que contienen p-aminodimetilamina
- Esperar la reacción de 10 a 15 min.

Resultados

- Aparición de color azul (Gamazo *et al.*, 2005).

IV. PRUEBA DE UREASA

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

Procedimiento

Se cultiva el microorganismo en slant en agar urea de Christensen. Este medio se complementa después del autoclavado con 50ml/l de urea. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir el enzima ureasa.

Interpretación

- Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa. Para revelar el resultado de esta prueba es importante tener en cuenta el tiempo de incubación ya que especies de *Proteus* vuelven alcalino el medio poco después de la inoculación y sus resultados deben ser leídos en las primeras 2-6 horas, mientras que *Citrobacter* y *Klebsiella pneumoniae* tienen actividad ureasa dentro de las 24-48 horas de incubación (Gamazo *et al.*, 2005).

V. PRUEBA DE MOTILIDAD

Reactivos

Extracto de carne, 3g
Peptona, 10g
NaCl, 5g
Agar, 4g
Agua destilada 1000ml

Procedimiento

Disolver los componentes por calentamiento hasta ebullición, ajustando previamente el pH a 7. Distribuir en tubos (10ml/tubo) y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Inocular por punción los 5mm superiores del medio y realizar observaciones macroscópicas a las 6, 24 y 48 horas.

Interpretación

Si la cepa a analizar es móvil se observará crecimiento radial desde la zona de inoculación hacia las paredes del tubo (Espinoza, 2004).

VI. PRUEBA DE POLI- β HIDROXIBUTIRATO

Reactivos

Negro Sudán B

Negro Sudán B	0.3 g
Etanol (95 %)	75 ml

Disolver el negro Sudán B en el etanol. Agregar 25 ml de agua destilada y mezclar bien.

Procedimiento

- Para esta prueba se utilizarán cultivos de 24 y 48 horas incubados a 35 °C en NFb semisólido.
- Preparar un frotis del velo en un portaobjetos limpio. Secarlo al aire y fijarlo a la llama.
- Cubrir el portaobjetos con el reactivo negro Sudán B y dejar reaccionar por no menos de 10 minutos. Eliminar el exceso de colorante y secar colocando una tira de papel secante sobre el frotis hasta que todo el colorante se absorba. Evitar mover o restregar el papel durante el secado. Levantar el papel con cuidado.
- Lavar el frotis con unas gotas de xilol para eliminar el exceso de colorante y volver a secar con papel secante.
- Contra teñir con safranina acuosa al 5% m/v durante 10 a 15 segundos. Lavar inmediatamente con agua de tubo y dejar secar al aire.

Interpretación

- En el microscopio y con el objetivo de inmersión examinar la preparación para detectar las partículas, las cuales aparecerán de color azul o negro en contraste con el rojo del citoplasma (Gamazo *et al.*, 2005).

VII. PRUEBA DE INDOL

El indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptófano. Con un medio rico en triptófano, el indol se puede detectar por su habilidad para combinarse con ciertos aldehídos para formar un compuesto coloreado. El ensayo constituye un método rápido para detectar organismos productores de

indol. Como indicador de la presencia del aldehído se usa el reactivo de Erlich. Es especialmente útil en la identificación preliminar de *Escherichia coli*, y para diferenciar de *Salmonella* (-).

Reactivos

Caldo triptófano

- Peptona 20.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Agua destilada 1000 ml

A este caldo se le incorpora triptófano en una concentración del 1%. El medio se esteriliza a 121° C durante 15 minutos. Dejar enfriar antes de su empleo y guardar a 4-10°C para su conservación.

Reactivo de Erlich

- p-dimetilaminobenzaldehído 1.0 g
- alcohol etílico, 95% 95.0 ml
- ácido clorhídrico, concentrado 20.0 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol (puede requerir un calentamiento suave), luego se agrega lentamente el ácido. El reactivo de color amarillo es estable por un año. Identificar el reactivo con una etiqueta y guardar refrigerado en botellas color caramelo.

Procedimiento

- Con un asa tomar material de una colonia aislada e inocular el caldo que contiene triptófano.
- Incubar a 37° C por 18 a 24 horas.
- Transferir 2 ml de la suspensión de caldo a un segundo tubo.
- Agregar 5 gotas del reactivo de Erlich por la pared del tubo.
- Agitar el tubo y observar un color rosado en la interfase entre el caldo y el reactivo.
- Si el ensayo es negativo, el cultivo se debe reincubar otras 24 horas.

Interpretación

Ensayo positivo: desarrollo de un color rojo en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de agregar el reactivo. Ensayo negativo: no hay cambio de color o hay un color amarillo en la interfase.

Consideraciones

- El pH óptimo para la actividad de la triptofanasa es ligeramente alcalino (7.4-7.8). La disminución del pH provoca una reducción en la producción de indol y una reacción falsamente negativa o débilmente positiva.
- Los cultivos a los cuales se les efectúa la prueba del indol deben ser incubados aeróbicamente. El descenso en la tensión de oxígeno disminuye la producción de indol.
- No debe emplearse un medio de peptona que contenga glucosa porque la elevada acidez producida por la fermentación del azúcar puede inhibir la actividad de la triptofanasa.
- El agregado de triptófano estimula la producción de indol, mientras que la glucosa la inhibe (Gamazo *et al.*, 2005).

VIII. REDUCCIÓN DE NITRATOS Y DENITRIFICACIÓN

Esta prueba se realiza para probar la capacidad de las bacterias para reducir los nitratos a nitritos, una característica que tiene a menudo valor diferencial.

Reactivos

Caldo Nitrado

- Extracto de carne 3,0 g
- Peptona 5,0 g

- Nitrato de potasio 1,0 g
- Agua destilada 1000,0 ml
- pH 7.0

Disuelva y esterilice en autoclave por 15 minutos a 121°C (15 libras de presión).

Reactivo de Griess

Solución A

- Acido sulfanílico 8,0 g
- Acido acético 5N 1000,0 ml

Solución B

- Naftilamina 5,0 g
- Acido acético 5N 1000,0 ml

Debido a que se ha demostrado que la naftilamina es carcinogénica, se ha recomendado su sustitución por otras sustancias tales como el -naftol, la N,N-Dimetil-1-Naftilamina ácido de Cleve (Ácido 5 amino 2 Naftilensulfónico).

Procedimiento

Con el asa de platino transfiera al medio una porción de cultivo puro. Incube a 37°C por 12 a 24 horas.

Interpretación

- Para determinar si el nitrato ha sido reducido a nitrito, después de la incubación, añádale al medio de cultivo, 2 gotas de solución A, y luego 2 gotas de la solución B del reactivo de Griess y mezcle. La aparición de una coloración rosada o roja indica que los nitratos han sido reducidos a nitritos. Si la reacción es negativa, añada una muy pequeña cantidad de polvo de Zinc. La aparición de una coloración rosada o roja confirma la negatividad de la reacción; en caso de que esto no suceda, significa que los nitratos han sido reducidos a N₂ gaseoso, es decir se ha producido una desnitrificación (Gamazo *et al.*, 2005).

ANEXO 3. Solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico (CIAT, 1988).

REACTIVO	CANTIDAD
Hipoclorito de sodio al 10 %	250 ml
Acido clorhídrico al 30 %	5 ml
Agua destilada	250 ml

ANEXO 4. Tabla de Mc Crady : 3 tubos por dilución (Universidad Complutense, 2001).

Número característico	Número de microbios	Número Característico	Número de microbios	Número característico	Número de microbios
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5

011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,5
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

ANEXO 5. Protocolo de extracción de ADN de bacterias y hongos.

Modificación de Centro Internacional de la PAPA, Francisco Jarrin

1. Realizar un cultivo líquido selectivo para bacteria u hongo, de 2ml.
2. Sembrar el contenido bacteriano (raspado) en el medio líquido.
3. Incubar por un periodo de 24 a 72 horas, (dependiendo de la bacteria).
4. Centrifugar por 8min a 14.000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante, luego colocar en el eppendorff una pequeña cantidad de arena de cuarzo, y con ayuda de un homogenizador, pulverizar al pellet, por un periodo de 45s.

NOTA: Evite dejar las muestras demasiado tiempo a temperatura ambiente.

6. Añadir 0.5ml de tampón de extracción sobre el macerado, y luego añada 300ul de cloroformo y/o cloroformo:isoamilalcohol 24:1. Nuevamente macere ligeramente para mezclar el tampón y el solvente.
7. Invertir los tubo varias veces, y luego incube las muestras a 55°C de 20 a 30 minutos. Tenga cuidado de no exceder esta temperatura pues el cloroformo hierve a 61°C! Invertir los tubos manualmente unas cinco veces cada 10 minutos.
8. Dejar que los tubos tomen la temperatura ambiente por unos cinco minutos y centrifugue a 14.000rpm en la micro centrifuga por 10 minutos.
9. Transferir el sobrenadante sin topar la interfase a un tubo nuevo, limpio y estéril.
10. Añadir de 1 a 1.5vol de Isopropanol, y déjelos durante 5 minutos en hielo o en un congelador para que precipiten los ácidos nucleicos.
11. Centrifugar los tubos por 3 minutos a 14.000rpm en una microcentrífuga Si el pellet de DNA no está firme centrifugue por tres minutos más.
12. Descartar el sobrenadante, y lave el pellet de DNA con etanol al 70% por una o dos veces.
13. Secar el pellet de DNA por 20 a 25 minutos, y posteriormente disuélvalo en 100ul tampón RTE con 1ul de RNAsa (10mg/ml). Dejar que la RNAsa actúe por 10 minutos.
14. Medir la concentración de DNA y ajuste la misma entre 5 a 20 ng/ul para una reacción de PCR.

Reactivos

TAMPÓN DE EXTRACCIÓN:

	Concentración final	para 500ml
Sorbitol	140mM	12, 75g
Tris HCl PH 8.0	220mM	13.32 g

EDTA	22mM	32140g
NaCl	800mM	23 376g
CTAB	0.8%	4g
Sarkosyl ;	1%.	50g
b-mercaptoethanol	0.2% (añadirse justo antes del uso y es opcional)	

TAMPÓN TE.

Trizma Base (10Mm)	1.211g/L
EDTA(1mM)	292g/L
pH final	8.0

TAMPÓN RTE,

Trizma Base (10mM)	1.211 g/L
EDTA(0.1 mM)	0.0292 g/L
pH final	8g

ANEXO 6. Cuantificación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

- ✓ Ensamblar la cubeta de electroforesis
- ✓ Preparar el gel de agarosa de acuerdo a la concentración y tamaño deseado

1. Preparar las muestras a cuantificar en un pedazo de Parafilm: 4 µl de DNA a cuantificar + 1 µl de blue juice, mezclar bien y cargar 2 µl de esta mezcla en los pozos del gel.
2. Cargar en el primer pozo del gel 2 µl de DNA Low Mass Ladder (Invitrogen).
3. Correr a 50 - 100 V o 60 mA por 10 - 25 min.
4. Llevar a la cámara UV, focalizar bien la imagen (intensidad de luz y tiempo de exposición) e imprimir en papel térmico (SIZE 5c es suficiente para la cuantificación).
5. Cuantificar la concentración de ADN en ng/µl comparando la intensidad de sus bandas con respecto a las del marcador (Morillo y Miño, 2010).

CUANTIFICACIÓN POR FLUOROMETRIA

1. Para preparar el buffer de cuantificación, utilizamos el siguiente cóctel:

1	x	n µl de Quant-it Reagent
199	x	n µl de Quant -it Buffer

 *n es el número de muestras que se va a cuantificar en el fluorímetro
2. Mezclar bien el mix de cuantificación.
3. En tubos eppendorf de 60 µl colocar 10 µl de los estándares 0 ng/µl y 100 ng/µl, así como el ADN de las muestras a cuantificar, con las respectivas etiquetas.
4. Adicionar 190 µl del buffer de cuantificación a cada muestra, dar un vortex y un punto de centrifuga y esperar 2 minutos antes de empezar a cuantificar. Las muestras deben permanecer siempre bajo oscuridad.
5. Una vez transcurrido el tiempo, empezar primero por la calibración del fluorímetro con los estándares 0 ng/µl y 100 ng/µl, seguidamente cuantificar las muestras de ADN.
6. El fluorímetro presenta dos tipos de lectura, la HS (ng/ml) y la BR (µg/ml).
7. Para calcular la concentración de las muestras, se usa la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestras} = \text{Valor QF} \times (200 / X)$$

Donde:

Valor QF = El valor dado por el fluorímetro

X = El volumen final de la muestra a cuantificar

- Esta ecuación genera un resultado con las mismas unidades que son dadas por el fluorímetro (Morillo E. y Miño G., 2010).

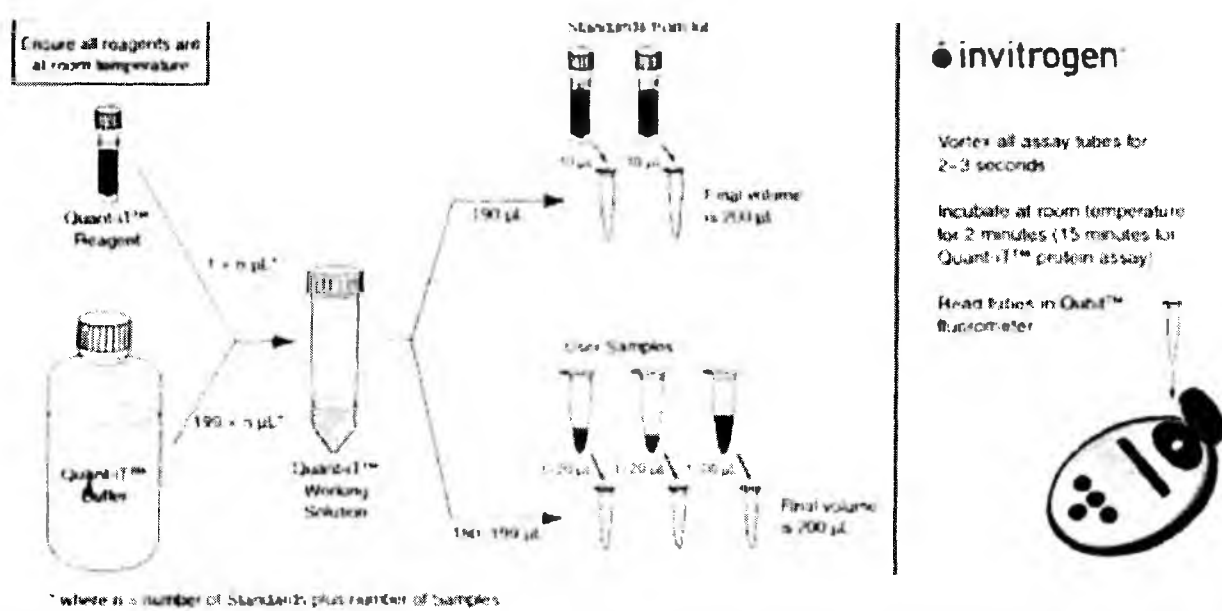


Fig. 2. Metodología para cuantificación de ADN por fluorimetría