



Supervivencia de *Azotobacter* y otros grupos microbianos en suelo seco almacenado

Survival of *Azotobacter* and other microbial group in dry soil by storage

Sánchez-Yáñez Juan Manuel^{1*} , Velázquez-Medina Adilene¹, Cabrera-Reinaldo Ignacio²,
Amador-Vargas Welker Leonardo³, Vela-Muzquiz Gerard Ronald⁴



Datos del Artículo

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.
Av. Fco J Mujica S/N, Col Felicitas del Río.
CP 58000, Morelia, Mich, México.

²Ministerio de Agricultura de la República de Cuba.
Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).
Av. 7ma. No 3005 e/30 y 32, Playa. CP 11300.
Zona Postal 13, La Habana, Cuba.

³Academia Militar de Medicina (AMMED)
Fuerte Tiuna, CP 1090
Caracas, Venezuela

⁴University of North Texas.
Department of Biological Sciences.
Denton, Tx. USA.

*Dirección de contacto:
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.
Laboratorio de Microbiología Ambiental.
Av. Francisco J Mujica S/N.
Col Felicitas del Río, CP 58.000 Morelia.
Michoacán, México.
Tel: +0052, 443322 Ext 4240.

Juan Manuel Sánchez-Yáñez
E-mail address: syanez@umich.mx

Palabras clave:

Suelos,
almacenaje,
quistes,
diversidad microbiana.

J. Selva Andina Res. Soc.
2022; 13(1):3-15.

ID del artículo: [154/JSARS/2021](https://doi.org/10.154/JSARS/2021)

Historial del artículo.

Recibido agosto 2021.
Devuelto noviembre 2021.
Aceptado diciembre 2021.
Disponible en línea, febrero 2022.

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Keywords:

Soil,
storage,
cysts,
microbial diversity.

Resumen

En suelos secos la supervivencia del género y especies de *Azotobacter*, es paralela a la de otros grupos microbianos nativos como actinomicetos y hongos de ese ambiente, dependiente de la capacidad de adaptación genética de cada uno, en combinación con algunas de las propiedades fisicoquímicas del suelo, y de las condiciones ambientales de almacén. Los objetivos de este trabajo fueron: i) analizar la supervivencia de *Azotobacter* en suelo recién colectado y almacenado por 11 y 30 años ii) caracterizar bioquímicamente *Azotobacter vinelandii* aislado estos suelos iii) dinámica de supervivencia de actinomicetos, bacterias y hongos en los suelos. Para cual cada uno de los suelos se conservó por distinto periodo de tiempo en contenedores de vidrio estériles a temperatura ambiente, de ahí diluyeron para cuantificar cada grupo en: agar nutritivo para bacterias, agar de caseína almidón para actinomicetos, agar Rosa de Bengala para hongos y agar Burk para *Azotobacter*. Los resultados mostraron que el número de *Azotobacter* supervivientes en el suelo almacenado por 30 años fue de 12×10^6 UFC/g, de 52×10^6 UFC/g en suelo seco por 11 años y de 300×10^6 UFC/g de suelo seco recién colectado. En el suelo de 30, 11 años se detectó una densidad de *Azotobacter* spp., inferior al suelo seco recién colectado. Se encontró diferencia en los perfiles bioquímicos de *A. vinelandii* de suelo almacenado por 30 años, en comparación el mismo género y especie en el recién colectado. Lo que anterior indica que las propiedades fisicoquímicas del suelo, el periodo de desecación fue crítico en la supervivencia de *Azotobacter* y de los otros grupos de microorganismos nativos de ese ambiente.

2022. *Journal of the Selva Andina Research Society*®. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

In dry soils, the survival of the genus and species of *Azotobacter* is parallel to that of other native microbial groups such as actinomycetes and fungi of that environment, depending on the genetic adaptation capacity of each one, in combination with some of the physicochemical properties of the soil, soil, and environmental storage conditions. The objectives of this work were: i) to analyze the survival of *Azotobacter* in soil recently collected and stored for 11 and 30 years ii) to biochemically characterize *Azotobacter vinelandii* isolated from these soils iii) survival dynamics of actinomycetes, bacteria and fungi in soils. For which each of the soils was kept for a different period of time in sterile glass containers at room temperature, from there they were diluted to quantify each group in: nutrient agar for bacteria, casein starch agar for actinomycetes, Rose Bengal agar for fungi and Burk agar for *Azotobacter*. The results showed that the number of surviving *Azotobacter* in soil stored for 30 years was 12×10^6 CFU/g, 52×10^6 CFU/g in dry soil for 11 years, and 300×10^6 CFU/g in freshly collected dry soil. In the soil of 30, 11 years, a density of *Azotobacter* was detected, lower than the dry soil recently collected. A difference was found in the biochemical profiles of *A. vinelandii* from soil stored for 30 years, compared to the same genus and species in the newly collected soil. The above indicates that the physicochemical properties of the soil, the drying period was critical in the survival of *Azotobacter* and other groups of microorganisms native to that environment.

2022. *Journal of the Selva Andina Research Society*®. Bolivia. All rights reserved.



Introducción

En el suelo existe una amplia diversidad de microorganismos nativos, tanto eucariontes como procariotas, como el género y especies de *Azotobacter*^{1,2}, heterotrófico, aerobio, que responde a condiciones de stress mediante la formación de una estructura de resistencia o quiste^{2,4} en el suelo o en condición análoga a ese ambiente⁵⁻⁷. Además, *Azotobacter* fija nitrógeno molecular (FNM), promueve el sano crecimiento de cultivos agrícolas a nivel limitado de nitrógeno (N) mineral⁸. Mientras, existen otros grupos microbianos con los que *Azotobacter* participa en la dinámica de los ciclos biogeoquímicos⁹⁻¹¹, de los principales elementos que sostienen la vida, como los actinomicetos, otros géneros de bacterias y hongos¹²⁻¹⁴. En el suelo la supervivencia de *Azotobacter*^{9,10} y de cada uno de los grupos señalados, dependen de la capacidad de respuesta fisiológica^{12,14,15}, al ambiente en que viven como las propiedades fisicoquímicas del suelo: el contenido de materia orgánica (MO) de origen vegetal que se acumula de las raíces vegetales de la composición química, de la biomasa microbiana que muere^{13,14}, al igual que de los minerales necesarios para la vida microbiana y vegetal, de la textura, lo que en conjunto afecta el pH del suelo^{12,16}, así como de la capacidad de retención de humedad, en repuesta a los cambios de temperatura^{13,14,15}. En específico, el género *Azotobacter* y las especies comunes^{1,4-6}, que coexisten cosmopolitas, con los actinomicetos y hongos que influyen en la capacidad productiva del suelo¹²⁻¹⁴. La información sobre la supervivencia de especies de *Azotobacter* en cada tipo de suelo^{1,5}, también se atribuye a las formas orgánicas de carbono que existen comúnmente en ese ambiente y que usan para crecimiento, en todos los suelos del

mundo, como los ácidos húmicos^{5,9}, compuestos orgánicos derivados de la mineralización de la lignina, compuesto natural en las plantas principalmente concentrado en las leñosas^{6,8,11}, un complejo fundamental en MO de origen vegetal¹⁴. Además de otras moléculas orgánicas de carbono como la celulosa, las hemicelulosas, la pectina, etc., cuando se degradan y/o mineralizan por la microbiota heterotrófica del suelo^{13,14}: actinomicetos¹⁷, bacterias¹⁸, hongos, etc^{19,20} bajan el pH que afectan negativamente la viabilidad de *Azotobacter*, al igual que la competencia y predación que existe en el suelo²¹⁻²³, influyen en la supervivencia de *Azotobacter*^{1,5,9} y de otros grupos microbianos nativos^{18,19}. En suelo no estéril, está demostrado que *Azotobacter* es capaz de sobrevivir por periodos de tiempo relativamente prolongados con o sin la formación de quistes^{2,3}, lo que implica que posee un mecanismo fisiológico distinto a lo reportado a las esporas^{1,3,4,7,9} que posee el género *Bacillus* bacilo Gram-positivo reconocido en el ambiente, porque con esas esporas enfrenta condiciones adversas en el suelo^{5,14,15,18,19,25}. Aparentemente similar a los actinomicetos nativos de este sitio, que sobreviven en latencia mediante diversas formas especializadas de resistencia^{17,21-24}. En ese sentido en suelo no estéril es limitada la información de la supervivencia del género y especies de *Azotobacter* y otros grupos microbianos nativos en suelo no estéril, sujetos a una desecación lenta por condiciones de almacenaje durante largos tiempos, por ello los objetivos de esta investigación fueron: i) analizar la supervivencia de *Azotobacter* en suelo recién colectado y almacenado por 11 y 30 años, ii) caracterizar bioquímicamente

Azotobacter vinelandii aislado estos suelos, iii) dinámica de supervivencia de actinomicetos, bacterias y hongos en los suelos.

Materiales y métodos

Origen y tipo de suelos analizados. Un total de 40 muestras de suelos no estériles colectados desde 1990 al 2011 y en el 2019 en las áreas de Austin, Fort Worth y Denton en el Texas, EUA en diferentes años fueron utilizadas en esta investigación, de los 18 suelos, 11 fueron Querno-zémico y 7 Arenosos, según la descripción la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura¹⁶: estos suelos se almacenaron en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente entre 25.5 ± 2.2 °C por 30 años, 3 suelos por 11 años: 2 de la serie Burleson, 1 de Crockett, y 19 suelos recién colectados: 9 de Birome, 6 de Burleson y 4 de Crockett, cada uno se conservó en viales estériles abiertos solo el día del análisis microbiológico.

Cuantificación de microorganismos supervivientes de suelos almacenados por diferentes periodos de tiempo. Con el propósito de establecer el número de microorganismos supervivientes en cada uno: los viales fueron colocados en un sitio esterilizado con radiación ultravioleta de onda corta 235 nm (de máxima actividad microbicida), libres de polvo, con una gasa estéril y etanol al 70 % fueron abiertos y flameados, se tomó 1.0 g de cada uno, se suspendió en tubos de 18 x 150 mm con 9 mL de solución salina (NaCl 0.85 % p/v) a pH 7.0, cada uno se agitó 30 s en un Vortex, luego se tomaron 0.2 mL de cada uno que se sembraron en diferentes medios de cultivo con la siguiente composición química^{21,24}: agar nutritivo (AN) g/L: extracto de carne 8.0, peptona 5.0, agar 15, agua destilada 1000 mL, el pH se ajustó a 6.8. Para enumerar los actinomicetos^{17,22,23}: agar de caseína almidón (ACA) g/L: caseína 10.0, almidón soluble 2.0,

KNO₃ 2.0, NaCl 2.0, KH₂PO₄ 1.0, CaCO₃ 0.02, agar 18, agua destilada 1000 mL, el pH se ajustó a 7.3. Para enumerar los propágulos de hongos¹⁹ agar Rosa de Bengala-estreptomocina (ARBE) g/L: glucosa 10, peptona 5.0, K₂PO₄ 1.0, MgSO₄ 7H₂O 0.5, Rosa de Bengala 33 mg, agar 15, (Difco Detroit, Mich), agua destilada 1000 mL, el pH se ajustó a 6.2 con H₂SO₄ 0.1 N, el sulfato de estreptomocina (antibiótico de amplio espectro) se esterilizo por filtración (filtro membrana de 0.2 µm), se agregó al agar base después de ser esterilizado y enfriado a 42 °C. En tanto que *Azotobacter* se enumeró y aisló en agar Burk (AB) g/L: glucosa 5.0, KH₂PO₄ 0.16, K₂PO₄ 0.64, NaCl 0.2, MgSO₄ 7H₂O 0.2, CaSO₄ 2H₂O 0.05, NaMoO₄ 2H₂O 0.01, FeSO₄ 0.003, agua destilada 1000 mL, ajustado se ajustó a pH a 6.8^{1,2,5,7,9}. Cuando las poblaciones microbianas de los suelos fueron relativamente elevadas se usaron diluciones con tres repeticiones, en los medios de cultivo previamente señalados AN, ACA, ARBE y AB se incubaron una semana a 30 °C^{18,20,26}, los valores numéricos de la cuenta viable en placa se reportaron como unidades formadoras de colonias (UFC)^{21,24}, o unidades formadoras de propágulos (UFP) para actinomicetos^{17,25} y hongos^{18,19} por gramo de suelo seco (SS). Los resultados se analizaron con el programa estadístico ANOVA Tukey p<0.05 %. Para la determinación del porcentaje de la reacción a la tinción Gram y dividirse entre: Gram-negativas, Gram-positivas: como las formadoras de esporas y no esporuladas, se tomaron 100 colonias cultivadas en AN de cada suelo y se tiñeron por la tinción Gram que posteriormente se observaron al microscopio luz^{21,22,24}. Todos los aislados bacterianos fueron conservados en suelo estéril, en perlas de cerámica estéril utilizados con base a experiencias obtenidas de otros métodos de preservación conocidos^{2,15}.

Perfil bioquímico de Azotobacter vinelandii de los suelos almacenados por 30 años. Para el aislamiento

de *A. vinelandii* supervivientes de cada suelo almacenado por 30 años se tomó 0.1 g que se sembró directamente en AB, cuando las colonias aparecieron mediante un pigmento fluorescente verde característico de *A. vinelandii*, se codificaron de acuerdo con el siguientes claves: Old-R, Old-8, Old-8A, Old-8b, Old-83, Old-E, Old-8r, Old-8c y Old-8i mientras que de las 19 muestras del suelo recién colectado se recuperaron 8 aislados de *A. vinelandii* codificadas como: S-6A, Wild, S-9, 16-AB, S-61, B-16A, L-2, D-1, S-6. Como referencia comparativa para identificar los aislados de *Azotobacter* de los suelos almacenados se usaron las cepas de colección de *A. vinelandii* WU-1 donada por el Dr. J Sadoff Michigan State University, Michigan, EUA, la UW donada por el Dr. J Page University of Alberta, Canadá, y la 2489 donada por el Dr. J Moreno de la Universidad de Granada, España. Todos los aislados y cepas de referencias se sembraron en AN para observar el pleomorfismo y la pureza de los posibles *A. vinelandii*^{2,5,8} se utilizó un microscopio de contraste de fases, mientras que para

la inducción de los quistes^{3,9,27}, los posibles aislados de *Azotobacter* se sembraron en n-butanol al 0.3 % (v/v) como sustituto de glucosa en el AB^{2,3}, entonces de cada suelo almacenado por 30 años se sembraron en AN: 10 de cada 100 consideradas similares que microscópicamente se relacionaron con *A. vinelandii*^{3,5}, o bien con el género *Bacillus*^{13,15} se separaron para identificarlos por las siguientes pruebas bioquímica movilidad, crecimiento en anaerobiosis, citocromo oxidasa, formación de ácido y gas de glucosa, lactosa, síntesis de acetil metil carbinol (Vogues-Proskauer), utilización de citratos como única fuente de carbono, hidrólisis de urea, generación de indol y formación de H₂S^{2,27-29}. Para la identificación de la cepa de *Citrobacter* se empelo una cepa de *C. freundii* perteneciente a la colección de bacterias entéricas del laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB-UMSNH³⁰.

Resultados

Tabla 1 Densidad de microorganismos aerobios heterotróficos nativos supervivientes de suelos secos texanos almacenados por diferentes periodos de tiempo

Microorganismos	UFC x 10 ⁶ /g de suelo		
	30 ¹	11 ²	Recién recolectado ³
Bacterias	12.0 ^{b*}	52 ^b	300 ^a
Actinomicetos	0.2 ^d	17 ^a	66.0 ^a
Hongos	0.2 ^d	0.1 ^d	71.0 ^a
<i>Azotobacter</i> spp.	5.2 ^b	15 ^a	52.0 ^a

1. Promedio de 18 muestras de suelo seco almacenado por 30 años,

2. promedio de 9 muestras de suelo seco almacenado por 11 años,

3. promedio de 19 muestras de suelo.

*valores con letra distintas indican diferencia estadística (P>0.05) según ANOVA/Tukey.

En la Tabla 1, se muestran la densidad de la población de los microorganismos heterotróficos aerobios nativos supervivientes de cada suelo de Texas USA, se registró, que el grupo bacteriano fue el más numeroso independiente del tiempo de almacenamiento. La diferencia entre el promedio de la densidad de la población bacteriana (DPB) del suelo almacenado por 30 años fue de 12.0 x 10⁶ UFC/g de suelo, sin

diferencia estadística con la densidad de 11 años, pero estadísticamente distinta e inferior al promedio de la población homóloga en el suelo recién colectado con 300 x 10⁶ UFC/g de suelo, el promedio de la DPB superviviente del suelo almacenado por 11 años fue de 52 x 10⁶ UFC/g de suelo apoya, que la capacidad de resistencia fisiológica de la población bacteriana a la pérdida de humedad o desecación del

suelo, es genética, dependiente de las propiedades físico-químicas de cada suelo que influyeron para que el tiempo de supervivencia haya sido menor en el suelo almacenado por 30 años y mayor en el suelo almacenado por 11 años, en tanto que el DPB en el suelo recién colectado fue 300×10^6 UFC. El promedio de la densidad de los actinomicetos supervivientes del suelo almacenado por 30 años fue de: 0.2×10^6 UFC/g de SS, estadísticamente diferente al promedio de la densidad de la población homóloga del suelo almacenado por 11 años, con 17.0×10^6 UFC/g de SS, sin diferencia estadística con el suelo recién

colectado con 66.0×10^6 UFC/g de SS. Mientras que el promedio de los propágulos fúngicos supervivientes fue de 0.2×10^6 UFC/g de SS almacenado por 30 años sin diferencia estadística con los 0.1×10^6 UFC/g de SS del almacenado por 11 años, pero con un valor estadísticamente diferente 71×10^6 UFC/g de SS recién colectado. Lo que apoya que, en parte por las limitaciones de la técnica de cuenta viable en placa, no se detectaron la totalidad de los propágulos de hongos viables en los suelos almacenados por 30 y 11 años en comparación con la densidad numérica registrada en el suelo recién colectado.

Tabla 2 Porcentaje de los grupos morfológicos, de acuerdo a la tinción de Gram, esporuladas o no, de las bacterias de cada suelo almacenado por diferentes periodos de tiempo

Categorías morfológicas*	30 ¹ %	Periodo en años 11 ² %	Recién colectados ⁹ %
Bacillos Gram-negativo	41.3 ^{a*}	39.0 ^a	30.0 ^a
Bacillos Gram-positivo	58.7 ^a	61.0 ^a	69.8 ^a
No esporulados	7.7 ^b	24.0 ^a	13.7 ^a
Esporulados	51.0 ^a	37.0 ^a	56.1 ^a
Relación Gram-negativo/Gram-positivo	0.70 ^c	0.63 ^c	0.43 ^c

1= promedio de 18 muestras 2= promedio de 3 muestras. 9= promedio de 19 muestras
*Valores con letra distintas indican diferencia estadística (P>0.05) según ANOVA/Tukey.

Tabla 3 Densidad de la población de *Azotobacter* supervivientes en el suelo almacenado de Texas, EUA por 30 años

Clave de la muestra del suelo*	Lugar de origen Texas EUA	Tipo de suelo	UFC/g de suelo seco $\times 10^6$ <i>Azotobacter</i> sp.
East	San Antonio	Quernozémico	0.30 ^{**}
Southside	San Antonio	Arenoso	0.30 ^c
Mat West	San Antonio	Quernozémico	0.30 ^c
12, 2,200	Austin	Quernozémico	0.09 ^d
A	Mission	Arenoso	10.0 ^a
61-3	Austin	Quernozémico	10.0 ^a
250-control	Austin	Quernozémico	13.0 ^a
2-8-63	Austin	Arenoso	11.0 ^a
J	Austin	Quernozémico	37.0 ^a
350 KR	Austin	Quernozémico	N. D
3.3 Control	Austin	Quernozémico	14.5 ^a
Downtown	Manor	Arenoso	6.0 ^b
Downtown	Brooks	Quernozémico	7.3 ^b
C.	Austin	Arenoso	1.0 ^b
Shadywood	Austin	Quernozémico	1.0 ^b
Control 5-23-63	Austin	Quernozémico	0.72 ^c
Control 9-63	Austin	Arenoso	0.10 ^c
Cadillac	Austin	Arenoso	0.69 ^c

N. D= No se detectó ningún posible *Azotobacter* spp **Valores con letra distintas indican diferencia estadística (P>0.05) según ANOVA/Tukey.

En la Tabla 2, se presentan los porcentajes de bacterias en el suelo almacenado por diferentes periodos

de tiempo, de acuerdo con la morfología y reacción a la tinción Gram, el mayor porcentaje fueron bacilos

Gram-positivo con 58.7 % en el suelo almacenado por 30 años. Con 61.0 % del suelo almacenado por 11 años y 69.8 % del suelo recién colectado. Es evidente el contraste con el porcentaje del grupo no esporulado, de manera esperada fue menor en el suelo

de 30 años, que tuvo diferencia estadística comparado, con el mayor por ciento en los no esporulados en el suelo de 11 años de almacenamiento, así como en el suelo recién colectado.

Tabla 4 Densidad de población de *Azotobacter* supervivientes en el suelo almacenado por 11 años

Clave del suelo*	Localidad en Texas EUA	Tipo de suelo	UFC x 10 ⁶ /g de suelo seco de <i>Azotobacter</i> sp.
D	Denton	Burleson	0.90 ^{b**}
FW	Forth Worth	Crockett	51 ^a
D-1	Denton	Burleson	42 ^a

Burleson = Arenoso, Crockett = Arenoso limoso **Valores con letra distintas indican diferencia estadística (P>0.05) según ANOVA/Tukey.

En la Tabla 3, se muestra la amplia densidad numérica de las especies de *Azotobacter* desde 0.09 x 10⁶ UFC del suelo clave 12, 2,200 de Austin, Tx hasta el máximo valor numérico 37 x 10⁶ UFC/g de SS codificado como J, almacenados por 30 años de Austin

Tx, ambos valores numéricos estadísticamente diferentes con los 7.3 x 10⁶ UFC/g del suelo codificado como Downtown, tipo Arenoso de Manor, Tx.

Tabla 5 Densidad de las poblaciones de *Azotobacter* de suelo recién colectados

Número de la muestra del suelo*	Tipo de suelo	UFC x 10 ⁶ /g de suelo
1	Birome	0.13 ^{c*}
2	Burleson	0.15 ^c
3	Crockett	250.0 ^b
4	Birome	0.3 ^c
5	Crockett	N.D.
6	Crockett	N.D.
7	Burleson	250.0 ^b
8	Birome	110.0 ^b
9	Birome	160.0 ^b
10	Birome	160.0 ^b
11	Burleson	430.0 ^b
12	Crockett	530.0 ^b
13	Burleson	400.0 ^b
14	Birome	300.0 ^b
15	Birome	4000 ^a
16	Burleson	4000 ^a
17	Burleson	800.0 ^b
18	Birome	900.0 ^b
19	Birome	1000 ^a

Birome = Arenoso-limoso., Burleson = Arenoso., Crockett = Arenoso-limoso, Suelos del condado de Denton, Texas., N. D= No se detectó ningún posible *Azotobacter* spp
*Valores con letra distintas indican diferencia estadística (P>0.05) según ANOVA/Tukey.

En general fue posible detectar una tendencia de *Azotobacter* para supervivir en mayor densidad en los suelos tipo Quernozémico codificados como los codificados como el 61-3, el 250-control, el J, el 3.3

control, localizados en Austin, Tx, y menor densidad de *Azotobacter* superviviente en los suelos tipo Arenoso codificado como 2-8-63 de Austin, Tx con 11 x 10⁶ UFC de SS, fue evidente que *Azotobacter* a pesar

de estar en un suelo Quernozémico, sobrevivió más que los Arenosos como los codificados Southside de San Antonio, A de Mission, Downtown de Menor, Control 9-63 y Cadillac de Austin

Independientemente de la ubicación geográfica de acuerdo a las condiciones ambientales se registraron menos *Azotobacter* en San Antonio, en comparación con los de Austin.

En la Tabla 4, se presenta que la densidad de la población de *Azotobacter* supervivientes en suelo almacenado por 11 años, se registraron desde 51×10^6 UFC/g de suelo tipo Crockett con clave FW de Forth Worth, Tx cuyo valor numérico tuvo diferencia estadística con los 0.90×10^6 UFC/g del SS codificado como D, tipo Burleson de Denton, Tx, aunque en el otro del mismo tipo codificado como D-1 se detectó mayor densidad 42×10^6 UFC acuerdo este resultado, lo que muestra que suelos similares en la misma área pueden contener diferente densidad de *Azotobacter*,

atribuido a que uno el D fue sometido a cultivo intensivo de *Zea mays* y el otro es un terreno usado para pastoreo de ganado vacuno^{12,16,27}.

En la Tabla 5 se presenta la población nativa de *Azotobacter*, en el suelo recién colectado del condado de Denton, Texas EUA que registraron un máximo de $4000 \text{ UFC} \times 10^6/\text{g}$ de los suelos con las claves 15 tipo Birome y el codificado como 16 tipo Burleson ambos valores numéricos fueron estadísticamente similares, pero con diferencia estadística con los $0.13 \text{ UFC} \times 10^6/\text{g}$ de suelo con la clave 1 Birome. En general el promedio de *Azotobacter* detectado en los suelos tipo Birome con las claves: 1,4,8,9,10,14,15,18 y 19 fue $574.1 \times 10^7 \text{ UFC/g}$ de SS valor numérico sin diferencia estadística, con la población de *Azotobacter* en los suelos Burleson claves: 2,7,11,13 fue de $188.0 \times 10^7 \text{ UFC/g}$ de SS, ambos con diferencia estadística con los suelos tipo Crockett claves: 3,5,6,12 fue de $382.5 \times 10^6 \text{ UFC/g}$ de SS, en algunos de los cuales con clave 5,6 no se detectó ninguna población nativa de *Azotobacter*.

Tabla 6 Comparación del perfil bioquímico de *Azotobacter vinelandii* recuperados de suelos almacenados por 30 años y de reciente aislamiento

Propiedades fisiológicas y bioquímicas	30 años ^a	recién colectados ^b
Temperatura e crecimiento (°C)		
18	+	-
30	+	-
37	-	+
Crecimiento en presencia del 1 % de NaCl	-	+
Utilización de:		
Fructosa	+	-
Glucosa	+	+
Sacarosa	+	+
Etanol	+	-
Etilenglicol	+	-
Galactosa	+	-
Rammosa	+	+

(+) = reacción positiva de la prueba y/o utilización (-) = reacción negativa de la prueba.

a= promedio de 12 aislados. b= promedio de 12 aislados.

En la Tabla 6, se presenta el perfil comparativo fisiológico y bioquímico de *A. vinelandii* supervivientes del suelo almacenado por 30 años comparado con el

mismo género y especie, recuperados de suelos recién colectados. Con base al perfil de las cepas de re-

ferencia de *A. vinelandii* WU-1, UW y 2489 fue similar a los aislados de *A. vinelandii* recuperados de suelos almacenados por 30 años, lo que confirmó que este grupo de *Azotobacter* pertenece a la especie *vinelandii*.

En la Tabla 7, se presenta, además de *Azotobacter*, se aisló otro género de bacteria Gram-negativa que de acuerdo al perfil bioquímico pertenece a *Citrobacter*

un grupo conocido como Enterobacteria que a pesar de ser descritas en principio como parte del intestino de humanos y animales supervivieron en el suelo a las condiciones de almacenamiento por 30 años, probablemente por mecanismos fisiológicos relacionados con la inducción de la latencia al stress nutricional y ambiental^{12,14}.

Tabla 7 Perfil bioquímico de un aislado bacteriano Gram negativo superviviente de suelo almacenado por 30 años

Característica bioquímica	<i>Citrobacter</i> sp. cepa V-7
Movilidad	-
citratos	+
Indol	-
H ₂ S	-
Ureasa	-
MR	-
VP	-
Glucosa	-
Lactosa	-

(+) = reacción positiva de la prueba. (-) = reacción negativa a la prueba.

Discusión

En la Tabla 1 se explica que las propiedades físicas, químicas, y biológicas del suelo favorecieron una mayor densidad de población nativa bacteriana heterotrófica aerobia^{21,24}. No obstante los resultados numéricos no indican la densidad real de la población microbiana heterotrófica aerobia nativa de cada suelo debido: i) limitaciones de la técnica de cuenta viable en placa, ii) la existencia de células viables no cultivables^{12,13,24}. La supervivencia de *Azotobacter*^{1,5,7,9} y otros grupos microbianos^{14,21,22} fue dependiente de la capacidad genética^{11,23} de cada uno, para adaptarse al stress en el suelo, derivados de las propiedades fisicoquímicas^{19,26}. Lo que apoya que los actinomicetos por ser autóctonos del suelo tuvieron una adaptación suficiente para tolerar a la desecación lenta y gradual de los suelos durante el almacenamiento^{12,13,21-23}. Mientras que son mínimos los reportes de la capacidad de supervivencia de estos microorganismos en el

suelo por periodos semejantes a los analizados en esta investigación⁹. Por ello los actinomicetos, fue el grupo superviviente en el suelo almacenado de 30 años por la amplia diversidad genética en sus estructuras de latencia y reproducción para la pérdida de agua durante la desecación^{12,14,21,22} que indujeron a la latencia, con la reducción de su velocidad de muerte^{19,23,25}. Mientras de la pobreza nutricional de cada suelo combinada con la baja humedad, fueron causantes del decremento de la población microbiana en específico de una menor densidad de propágulos de hongos^{14,19,21}. En ninguno de los suelos analizados se detectaron levaduras¹⁴, lo que se atribuyó a la desecación que provocó la salinidad, con el descenso de humedad, al decremento del pH y la carencia de MO simple o de relativa fácil degradación^{14,19,20}.

En la Tabla 2 se muestra que la población bacteriana esporulada, representa el grupo que forma una estructura especializada o espóra que tolera la desecación y otras condiciones adversas al crecimiento, que en consecuencia les permite permanecer en latencia por

tiempo indefinido, hasta el momento en que las condiciones nutricionales y ambientales les son favorables para activarse y reproducirse^{12,14,15,21}, como se observó en la población bacteriana esporulada de los suelos almacenados por 30 años, en comparación con la misma población esporulada aisladas de los suelos almacenados por 11 y los suelos recién colectados. El hecho de que en los suelos la población bacteriana no esporulada haya alcanzado porcentajes entre el 7 y el 37 %, demuestra que en este grupo existen géneros y especies bacterianas que tienen genéticamente mecanismos fisiológicos similar a la latencia, para tolerar el stress por falta de agua, que causa un aumento en la salinidad, además de la ausencia de MO de fácil degradación. Sin poseer estructuras especializadas para supervivir a las condiciones adversas de tipo físico, químico y biológicas existentes en esos suelos^{12,14,19,21,25}.

En la Tabla 3 se muestra la evidencia que apoya que el género *Azotobacter* tiene la capacidad genética de supervivencia, similar a la reportado en los géneros y especies bacterianas que sintetizan esporas^{9,14,19,25}. En general una respuesta específica microbiana a la desecación del suelo, por incremento en la salinidad, es el decremento de la viabilidad de las células vegetativas^{20,26}, pero en el caso de *Azotobacter* existe la evidencia, de que con o sin quistes pueden supervivir en diversos tipos de suelos relativamente^{27,28}. Se reporta en la literatura la formación de quistes en *Azotobacter* no es necesariamente el principal mecanismo fisiológico de tolerancia al stress por desecación y salinidad en el suelo^{1,4,9}. Fue evidente que las propiedades fisicoquímicas de los suelos texanos y la ubicación geográfica influyeron en la supervivencia de *Azotobacter*, lo que apoya, a la distribución de algunos de los principales grupos microbianos tienen un genoma que se adapta a una amplia variedad de hábitats como los encontrados en los suelos de Texas, EUA^{14,19,22,26,27}.

En la Tabla 4 sugiere que debido a las propiedades fisicoquímicas de los suelos texanos como la concentración de MO, salinidad y disminución de humedad de cada suelo, fueron factores limitantes que influyeron en la densidad de las poblaciones de *Azotobacter* supervivientes, lo que apoya que tienen una capacidad fisiológica de origen genético de adaptación al stress del suelo, por ser un género nativo en la mayoría de los suelos del mundo, lo que hace posible recuperarlo, al igual que otras especies, que viven libremente o en asociación con especies vegetales silvestres y domesticas^{29,31,32}.

En la Tabla 5 se observó una diferencia estadística entre la densidad de la población de *Azotobacter* presentes en los suelos tipo Crockett, en comparación con la densidad de las poblaciones de *Azotobacter* de los suelos tipo Birome y Burleson. En principio por las propiedades fisicoquímicas de los suelos analizados, en el caso de Birome de textura arenosa-arcillosa, pobre en MO, pH alcalino. A diferencia del Burleson de textura arcillosa, con bajo nivel de MO y pH ligeramente alcalino. Por lo que en suelos tipo Birome se detectó un intervalo de variación de la población de *Azotobacter* desde 0.13×10^6 hasta 400.0×10^7 UFC/g de SS, con valores numéricos sin diferencia estadística comparados con la población de *Azotobacter* de la serie Burleson, lo que apoya que *Azotobacter* y sus especies son cosmopolitas de estos suelos independientemente de la vocación agrícola y/o ganadera de explotación: para pastoreo o bien vírgenes situación observada en los suelos analizados del centro norte del estado de Texas, EUA^{29,31-33}.

En la Tabla 6 fue evidente que los aislados de *A. vinelandii* de los suelos almacenados por un largo periodo de tiempo mostraron una mayor flexibilidad y/o diversidad metabólica según el perfil bioquímico de *A. vinelandii* provenientes de suelos almacenado por 30 años en relación al espectro de crecimiento con diferentes fuentes de carbono y energía que se

demonstró utiliza, acorde a lo reportado en la literatura^{2,7,8}. Lo anterior fue corroborado por la respuesta de las cepas de *A. vinelandii* usadas como referencia. En la Tabla 7 *Citrobacter* es un género de Enterobacterias que supervivieron al stress nutricional, baja humedad y salinidad según se reporta pueden hacerlo otros géneros de bacterias entéricas en el suelo^{30,34,35}. El perfil bioquímico de identificación de este aislado recuperado de suelo almacenado por 30 años, comparado con la cepa de referencia *C. freundii* corrobora que pertenece a *Citrobacter* reportado en la literatura que existe en el suelo de libre de raíces, con un potencial genético benéfico para plantas silvestre del desierto³⁰. Por lo que este es uno de los primeros reportes de la supervivencia en el suelo de este género por un periodo de tiempo de 30 años.

Fuente de financiamiento

Proyecto 2.7 (2022) de la CIC-UMSNH, Morelia, Mich, México. BIONUTRA, S. A. de CV, Maravatío, Michoacán, México.

Conflictos de intereses

Los participantes en esta investigación aseguramos que no existe ningún problema de intereses relacionados con la planeación, ejecución y reporte de esta investigación que comprometa el valor de los resultados obtenidos o sus consecuencias en términos científicos, técnicos, o de cualquier otro tipo.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigación Científica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. México, por la información y apoyo. A la Coordinación de la Investigación Científica (2022) de la

UMSNH, Morelia, Michoacán, México, por las facilidades.

Consideraciones éticas

La aprobación de la investigación por el Comité de Ética, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, siguió las pautas establecidas para este comité.

Limitaciones en la investigación

Los autores declaran que no hubo limitaciones en la investigación.

Aporte de los autores en el artículo

Gerard Roland Vela-Muzquiz, por el apoyo a la investigación en el trabajo experimental y discusión. *Adilene Velázquez-Medina*, revisión de literatura para material, métodos y resultados. *Reinaldo Ismael Cabrera*, análisis estadístico de resultados. *Amador Vargas Leonardo*, revisión de antecedentes y resultados. *Juan Manuel Sánchez-Yáñez*, realización de la fase experimental, resultados, discusión, análisis estadísticos y artículo final.

Se dedica este trabajo a la memoria del *Dr. Gerard Roland Vela-Muzquiz* por el compromiso, apoyo y guía para la formación de profesionales del mundo de la Microbiología durante 40 años en la University of North Texas, Denton, Tx. EUA, gracias.

Literatura citada

1. Kizilkaya R. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the

- microbiological properties of soils. *J Environ Biol* 2009;30(1):73-82.
2. Becking JH. The Family Azotobacteraceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*. New York: Springer; 2006. p. 759-83. DOI: https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_26
 3. Trejo A, Moreno S, Cocotl-Yañez M, Espín G. GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett* 2017;364(2):fnw278. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw278>
 4. Lopez JG, Vela GR. True morphology of the Azotobacteraceae-filterable bacteria. *Nature* 1981;289(5798):588-90. DOI: <https://doi.org/10.1038/289588a0>
 5. Ballesteros F, González-López J, de la Rubia T, Moreno J, Aneiros J, Ramos-Cormenzana A. Growth of *Azotobacter vinelandii* in dialysed soil medium: studies upon the life cycle. *Ann Inst Pasteur Microbiol (1985)* 1986;137A(1):55-64. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0769-2609\(86\)80005-9](https://doi.org/10.1016/s0769-2609(86)80005-9)
 6. Jnawali AD, Ojha RB, Marahatta S. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability-a review. *Adv Plants Agric Res* 2015;2(6):250-3. DOI: <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>
 7. Barnes RJ, Baxter SJ, Lark RM. Spatial covariation of *Azotobacter* abundance and soil properties: a case study using the wavelet transform. *Soil Biol Biochem* 2007;39(1):295-310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.08.001>
 8. Noar JD, Bruno-Bárcena JM. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology* 2018;164(4):421-36. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>
 9. Moreno J, Gonzalez-Lopez J, Vela GR. Survival of *Azotobacter* spp. in Dry Soils. *Appl Environ Microbiol* 1986;51(1):123-5. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.51.1.123-125.1986>
 10. Aquilanti LA, Favilli F, Clementi F. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol Biochem* 2004;36(9):1475-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.024>
 11. Lenart A. Occurrence characteristics and genetic diversity of *Azotobacter chroococcum* in various soils of Southern Poland. *Pol J Environ Stud* 2012; 21(2):415-24.
 12. Brookes P, Kemmitt S, Dungait J, Xu J. The survival strategy of the soil microbial biomass. *Geophys Res Abstr* 2014;16:EGU2014-15038-1.
 13. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(12):6578-83. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
 14. Manzoni S, Schimel JP, Porporato A. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. *Ecology* 2012;93(4):930-8. DOI: <https://doi.org/10.1890/11-0026.1>
 15. Vilain S, Luo Y, Hildreth MB, Brözel VS. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(7):4970-7. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03076-05>
 16. Guía para la descripción de suelos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Italia. 2009.
 17. Arifuzzaman M, Khatun MR, Rahman H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *Afr J Biotechnol* 2010;9(29):4615-9.

18. Davis KE, Joseph SJ, Janssen PH. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(2):826-34. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.826-834.2005>
19. Blazewicz SJ, Schwartz E, Firestone MK. Growth and death of bacteria and fungi underlie rainfall-induced carbon dioxide pulses from seasonally dried soil. *Ecology* 2014;95(5):1162-72. DOI: <https://doi.org/10.1890/13-1031.1>
20. Van Elsas JD, Smalla K, Lilley AK, Bailey MJ. Methods for sampling soil microbes In: Hurst CT, Crawford RL, Knudson GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, editors. *Manual of environmental microbiology*. 2nd Edition. Washington DC: ASM Press; 2002. p 505-15.
21. Vieira FC, Nahas E. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiol Res* 2005;160(2):197-202. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.01.004>
22. Ghorbani-Nasrabadi R, Greiner R, Alikhani H A, Hamed J, Yakhchali B. Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. *J Soil Sci Plant Nutr* 2013;13(1):223-36. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000020>
23. Goodfellow M, Williams ST. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 1983;37:189-216. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>
24. Balestra GM, Misaghi IJ. Increasing the efficiency of the plate count method for estimating bacterial diversity. *J Microbiol Methods* 1997;30(2):111-7. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00056-0)
25. Bär M, von Hardenberg J, Meron E, Provenzale A. Modelling the survival of bacteria in drylands: the advantage of being dormant. *Proc Biol Sci* 2002;269(1494):937-42. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1958>
26. Aislabie J, Broady P, Saul D. Culturable aerobic heterotrophic bacteria from high altitude, high latitude soil of La Gorce Mountains (86°30'S, 147°W), Antarctica. *Antarct Sci* 2006;18(3):313-21. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954102006000368>
27. Samal DPK, Ray P, Sukla LB, Shukla V. Isolation and screening of *Azotobacter* spp. for plant growth promoting properties and its survival under different environmental stress conditions. *Biointerface Res Appl Chem* 2020;10(2):5188-92. DOI: <https://doi.org/10.33263/BRIAC102.188192>
28. Czaban J, Wróblewska B. The Effect of bentonite on the survival of *Azotobacter chroococcum* in sandy soil in a long-term plot experiment. *Pol J Environ Stud* 2017;26(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.15244/jpoes/64744>
29. Channal HT, Alagawadi AR, Bharamagoudar TD, Udupa SG, Patil PD, Mannikeri IM. *Azotobacter* population as influenced by soil properties in some soils of north Karnataka. *Curr Sci* 1989;58:70.
30. Loera TML, Sánchez-Yáñez JM, Peña-Cabriales JJ. Acetylene reduction activity on the root cactaceous plants. *Rev Latinoam Microbiol* 1996;38:7-15.
31. Mazinani Z, Aminafshar M, Asgharzadeh A, Chamani M. Effect of *Azotobacter* population on physico-chemical characteristics of some

- soil samples in Iran. *Ann Biol Res* 2012;3:3120-5.
32. Jnawali AD, Ojha RB, Marahatta S. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability-a review. *Adv Plants Agric Res* 2015;2(6):250-3. DOI: <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>
33. Kalaigandhi V, Kannapiran E, Harimuraleedharan AM, Sivakumar T, Arasu VT. *Azotobacter* population in rhizosphere and non-rhizosphere sediments of tondi coast. *Technol* 2010;1:63-5
34. Sjogren RE. Prolonged survival of an environmental *Escherichia coli* in laboratory soil microcosms. *Water Air Soil Pollut* 1994;75(3-4):389-403. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00482948>
35. Zhang T, Wang H, Wu L, Lou J, Wu J, Brookes PC, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu Province, China. *PLoS One* 2013;8(12):e81178. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081178>

Nota del Editor:

Journal of the Selva Andina Research Society (JSARS) se mantiene neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales publicados en mapas y afiliaciones institucionales.