Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE:
Dr. Eduardo Valenzuela F.
Instituto de Microbiología
Facultad de Ciencias

AISLAMIENTO Y TAXONOMÍA DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* RECOLECTADAS EN SUELOS DE UN BOSQUE DE *PINUS RADIATA* Y UNA PRADERA PERMANENTE EN DISTINTAS ÉPOCAS DE MUESTREO

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al **Grado de Licenciado en Ciencias Biológicas.**

FRANCISCO JAVIER MÁRQUEZ TORRES

Valdivia – Chile

2007

Dedico esto primeramente a mis padres por estar a mi lado y apoyarme en todo momento, darme ánimo, principios, amor, cariño, formación de calidad y un gran espíritu de superación, segundo a mi hermano por ser mi mejor amigo y estar conmigo siempre, dándome una mano cuando lo necesite. A mis amigos Karina, Mariana, Maximiliano, Natalia y Sandra por ayudarme en los momentos mas difíciles siendo un apoyo muy importante en mi formación Universitaria y en los últimos años, sobre todo en el presente trabajo.

A toda mi familia que siempre me apoyo en toda circunstancia, en especial a mi tío Daniel y sobre todo a mi más grande admiración, mi abuelita Elsa.

Padre Nicanor por siempre estar presente en los momentos que necesite una palabra de aliento y acercamiento a algo que es sagrado para mí.

Y obvio lo más importante, Dios que es mi compañero y que siempre estuvo conmigo para nunca dejarme flaquear.

GRACIAS DE TODO CORAZON

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros y más grandes agradecimientos a todo el personal del Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile, en especial a Don Nelson, Don Julio, profesora Maria Ines, Señora Teresa, y Señora Rosita.

Agradezco al Dr. Germán Reinhardt director del Instituto de Microbiología por su ayuda.

Agradezco a mi directora de escuela Dra. Gladis Ruiz por su ayuda y confiar en mí en el transcurso de la carrera.

Agradezco también a mi amigo Maximiliano Silva por ayudarme en este trabajo y a mi amiga Natalia Paredes, gracias por todo.

Por ultimo también agradezco a Fabián Barrientos, ya que gracias a él se realizó el presente estudio.

Francisco Javier Márquez Torres.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág.

1. RESUMEN…….. 1

1.1 Summary……... 2

2. INTRODUCCIÓN……. 3

2.1 Hipótesis……... 10

2.2. Objetivos……. 10

2.2.1 Generales……..... 10

2.2.2 Específicos……. 10

3. MATERIALES Y MÉTODOS..... 11

3.1. Materiales……... 11

3.1.1 Material Biológico……. 11

3.1.2 Reactivos…… 11

3.1.3 Equipos……... 12

3.1.4 Otros……... 12

3.2 Métodos…… 12

3.2.1 Recolección de muestras de suelo…….. 12

4. RESULTADOS……... 21

4.1 Taxonomía de bacterias aisladas en suelo de bosque de *P.radiata*…….. 21

4.2 Taxonomía de bacterias aisladas en suelo de pradera permanente……... 26

4.3 Comparación de las especies del género *Bacillus* con la época de recolección de muestras desde los suelos de bosque de *P.radiata* y pradera permanente……. 30

4.4 Poblaciones bacterianas del género *Bacillus* aisladas de suelos de bosques de *Pinus radiata* de acuerdo a su relación con parámetros físicos……... 33

4.5 Poblaciones bacterianas del género *Bacillus* aisladas de suelo de pradera permanente de acuerdo a su relación con parámetros físicos……... 36

5. DISCUSIÓN……... 39

5.1 Conclusiones…… 46

6. LITERATURA CITADA…….. 47

7. ANEXOS……. 55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. A: Muestra de *Bacillus* con tinción de Wirtz a un aumento de 100X… 14

B: Tipos de esporas presentes al interior del cuerpo de la bacteria del género *Bacillus*…….. 14

Figura 2. A: Prueba de Voges Proskauer reacción negativa…… 17

B: Prueba de Voges Proskauer reacción positiva……. 17

Figura 3. A: Prueba de Citrato reacción positiva……. 18

B: Prueba de Citrato reacción negativa…… 18

Figura 4. Distribución porcentual de bacterias recolectadas en otoño, en muestras de suelo de bosque de *P.radiata*……... 22

Figura 5. Distribución porcentual de bacterias recolectadas en invierno, en muestras de suelo de bosque de *P.radiata*……... 23

Figura 6. Distribución porcentual de bacterias recolectadas en primavera, en muestras de suelo de bosque de *P.radiata*……... 24

Figura 7. Distribución porcentual de bacterias recolectadas en otoño, en muestras de suelo de pradera permanente…… 26

Figura 8. Distribución porcentual de bacterias recolectadas en invierno, en muestras de suelo de pradera permanente…… 27

Figura 9. Distribución porcentual de bacterias recolectadas en primavera, en muestras de suelo de pradera permanente…… 28

Figura 10. Comparación de especies del género *Bacillus* recolectadas en suelos de pradera permanente y bosque de *P. radiata*, muestreo de otoño……. 30

Figura 11. Comparación de especies del género *Bacillus* recolectadas en suelos de pradera permanente y bosque de *P. radiata*, muestreo de invierno……. 31

Figura 12. Comparación de especies del género *Bacillus* recolectadas en suelos de pradera permanente y bosque de *P. radiata*, muestreo de primavera…….. 31

Figura 13. Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de bosque de *P. radiata* de acuerdo a la temperatura……... 33

Figura 14. Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de bosque de *P. radiata* de acuerdo a la humedad……... 34

Figura 15. Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de pradera permanente de acuerdo a la temperatura…… 36

Figura 16. Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de pradera permanente de acuerdo a la humedad…..…… 37

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.

Recetas medios de cultivos y reactivos…… 56

ANEXO 2.

Tabla 1. Resumen de especies obtenidas en cada muestreo, tanto en suelo de *P. radiata* y pradera permanente……. 59

Tabla 2. Resumen de la humedad en los distintos sectores muestreados y en las distintas épocas de recolección…….. 60

Tabla 3. Resumen de la temperatura en los distintos sectores muestreados y en las distintas épocas de recolección…….. 60

Tabla 4. Clave para la taxonomía bacteriana……. 61

ANEXO 3.

Fotografías sector de muestreo……... 62

Foto 1. Salida sur de Valdivia donde se realizó la recolección de suelos para el presente estudio……. 62

Foto 2. Entrada al sector de muestreo……... 63

Foto 3. Sector de muestreo visto desde la carretera…….. 63

Foto 4. Bosque de *Pinus radiata*……. 64

Foto 5. Sector de muestreo bosque de *Pinus radiata*……... 64

Foto 6. Pradera permanente……. 65

Foto 7. Sector de muestreo pradera permanente……. 65

Foto 8. Intersección entre ambos sectores de muestreo……. 66

Foto 9. Intersección entre ambos sectores muestreados…… 66

1. RESUMEN

Existe una gran variedad de bacterias presentes en los distintos suelos, pero sólo el género *Bacillus* tiene la particularidad de presentar endosporas, estas son formadas cuando la especie no se encuentra cómoda en ambientes determinados, lo cual les permite estar presentes en los distintos habitats, hasta darse las condiciones óptimas para su desarrollo.

En el presente estudio las muestras de suelo obtenidas para aislar estas bacterias, se recolectaron a 19 kilómetros a la salida sur de la ciudad de Valdivia, en bosque de *Pinus radiata* y pradera permanente, al término de las estaciones de otoño, invierno y primavera, determinándose cuali-cuantitativamente las cepas bacterianas, mediante la posición de la endospora, su reacción al Gram y pruebas bioquímicas, a modo de determinar las distintas taxas.

En los resultados obtenidos la especie que presentó mayor porcentaje en suelos de *P. radiata* fue *B. subtilis var. niger* (38%), en época de invierno y la menor *B. megaterium* y *B. stearothermophilus* (2%), en las 3 épocas de muestreo. En cuanto a la diversidad, se registraron en las 3 estaciones las mismas especies. En suelos de pradera permanente la especie que presentó mayor porcentaje fue *B. cereus* (28%) en la época de invierno y las menores fueron *B. brevis* y *B. circulans* (2%), correspondiente a las épocas de invierno y primavera. En cuanto a la diversidad, el 85% de las especies fueron similares en los 3 muestreos.

La comparación de los dos sectores muestreados versus la diversidad de especies, sólo 9 coinciden en ambos suelos estudiados. En cuanto a los parámetros físicos, estos no afectarían a estas bacterias, ya que si estos fluctuaran, ellas formarían endosporas como estructura de resistencia.

1.1 Summary.

There is a great variety of bacteria present in different types of soils, but only the *Bacillus* gender is able to present endospores, which are formed when a species does not fit in a comfortable environment. This allows the species to survive in different habitats until there are optimal conditions for its development.

In the following study, the soil samples obtained to isolate the bacteria were collected 19 kilometers south of Valdivia in both a *Pinus radiata* forest and a permanent prairie at the end of Fall, Winter and Spring; obtaining qualitative and quantitative studies of the bacterial strain, throughout the position of the endospore, its reaction to Gram and biochemical tests. This way, it was possible to determine different taxa.

In the results obtained, the species that presented a larger percentage in *P. radiata* soils were *B. subtilis var. niger* (38%) in Winter, and the lowest percentage were those of *B. megaterium* and *B. stearothermophilus* (2%) in all three seasons. As far is diversity is concerned, all the species were registered in all three seasons. In permanent prairie soils, the species that presented a higher percentage was *B. cereus* (28%) in winter and the lowest percentages were from *B.brevis* and *B. circulans* (2%), corresponding to winter and spring. In this case, referring to diversity, an 85 % of the species were similar in the 3 seasonal samplings.

In the comparison of both sampled sectors versus the diversity of species, only 9 of them match in both studied soils. Apparently, the physical parameters do not affect these bacteria, because if they did they would form endospores in their resistance structure.

2. INTRODUCCIÓN

Hoy en día se conoce la existencia de una gran variedad de microorganismos que habitan diferentes tipos de suelos, donde degradan o transforman la materia orgánica muerta que proviene principalmente de la vegetación, de los animales y microorganismos que habitan estos ecosistemas (Tate, 2000. Maragaño, 2003).

Uno de los principales microorganismos que se encuentran en los suelos son las bacterias y dentro de este grupo, las formadoras de endosporas, el género *Bacillus*. La endospora es una estructura especializada resistente a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos (Foster, 2001. Starr, 1981). En consecuencia, las bacterias forman esta estructura para resistir las condiciones adversas del ambiente, también la pueden llegar a formar como una defensa metabólica (Foster, 2001). Por lo tanto, la formación de la endospora está dada por las condiciones del medio en que se encuentran estas bacterias (Schelegel, 1997). Estas endosporas pueden sobrevivir independientemente de la célula madre y pueden ser aisladas desde una gran variedad de sustratos, dada su resistencia al aire seco, al largo periodo de sobrevivencia bajo condiciones adversas (Holt *et. al*., 1984), y a sus características termorresistentes, ya que pueden llegar a soportar desde 80°C a 100°C de temperatura. La resistencia al calor de las endosporas fue reconocida en *Bacillus subtilis* por Cohn en 1877.

La formación de la endospora es el resultado de una serie de cambios controlados genéticamente que son observados como una forma primitiva de diferenciación celular (Piggott y Coote, 1976, citado por Starr, 1981).

Uno de los principales géneros bacterianos que producen endospora corresponde a *Bacillus*; las bacterias pertenecientes a ese género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en suelo, agua y como parte de la flora intestinal normal de algunos mamíferos, incluyendo al hombre (Castillo *et. al.*, 2004),

Las bacterias del género *Bacillus* fueron una de las primeras en ser descritas, y han jugado un rol principal en el desarrollo de la Microbiología. Este género fue descubierto en 1872 por Cohn, quien renombró la inadecuada descripción de Ehrenberg; de *Vibrio subtilis* a *Bacillus subtilis*.

Entre las características mas importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están: forma bacilar, movilidad flagelar por flagelos insertados en forma perítrica, pueden llegar a medir de 0,5-2,5 a 1,2-10 μm, además son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, catalasa positiva, quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo o realizan una respiración aerobia (Holt *et. al.*, 2000). También cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno. Una cualidad adicional por la cual son muy estudiadas estas bacterias, es que presentan una potencial capacidad para producir antibióticos, pudiendo servir como antifúngico, para proteger a plantas de enfermedades producidas por hongos (Castillo *et. al.*, 2004).

Las bacterias del género *Bacillus* se describen como termófilas (Foster, 2001), pero según Cameron y Esty en 1926 (citado por Starr, 1981) el término no sería aplicable para la separación de especies, sin embargo Gordon y Gibson (citado por Starr, 1981) en la octava edición del

Manual de Bergey´s, indica 6 especies de *Bacillus* que crecen hasta 55°C, por lo que considera que la gran mayoría de estas bacterias son termófilas. Por el contrario, otras especies crecen a temperatura ambiente, pero no a más de 65ºC y ellas son descritas como termófilas facultativas (Farrell y Campbell, 1969, citado por Holt *et. al.* 2000). Posteriormente Holt *et. al.* (1984) indicaron que las bacterias del género *Bacillus* son psicrófilas a termófilas, o sea, pueden crecer en un amplio rango de temperatura. Por otra parte, poseen además una alta habilidad fisiológica; soportando altas salinidades y distintos pH.

Como se dijo anteriormente, la mayoría de los *Bacillus* aerobios formadores de endosporas se encuentran en el suelo, generalmente en la zona de la rizosfera donde hay una gran cantidad de aminoácidos, vitaminas y carbohidratos, siendo la mas fácil de encontrar en grandes cantidades, la especie *Bacillus cereus* (Starr, 1981).

La endospora de los *Bacillus* generalmente está formada por proteínas deshidratadas utilizando el ácido poli-β-hidroxibutírico en aerobios y polisacáridos en los anaerobios. Estas endosporas tienen un largo tiempo de duración, observándose que algunas han llegado a soportar de 200 a 400 años, hasta 1000 años, pero el grado de resistencia de la endospora depende ampliamente de las condiciones del entorno bajo las cuales fueron formadas (Holt *et. al.*, 1984).

Algunas especies de *Bacillus* son patógenas para el hombre, como *Bacillus anthracis,* microorganismo aerobio, Gram positivo, la cual forma colonias de superficie rugosa, de color gris claro y blanco con aspecto de vidrio traslúcido, planas ligeramente convexas, bordes redondos e irregulares y de consistencia espesa. El contagio se realiza frecuentemente por medio

de las vías respiratorias y los principales síntomas del portador son fiebre, vómitos, escalofríos y disnea. Los cuadros con desenlace mortal en el transcurso de tiempo de 3 días ocurren en el 95 % de los casos. Esta enfermedad puede afectar a nivel del tracto gastrointestinal, cutáneo y como se dijo a nivel respiratorio (Barriga *et. al.,* 2001). Otra especie patógena es *Bacillus cereus*, anaerobio facultativo, móvil que se presenta en los alimentos y produce una enfermedad emética, los cuadros clínicos mas comunes son los estados diarreicos y vómitos (Oviedo, 1996).

Las especies del género *Bacillus* pueden producir antibióticos, como la especie *Bacillus subtilis* que secreta el antibiótico llamado Bacitracina-A que ayuda a la quimioterapia contra la meningitis bacteriana. Otro como *Bacillus polymyxa* produce el antibiótico Polimixina-B, usado en la quimioterapia contra las infecciones producidas por bacterias del género *Pseudomonas,* al igual que *Bacillus brevis* que producen los antibióticos Tirocidina-A y Gramicidina-S que tiene efectos similares a las Polimixinas (Iañez, 2003).

Muchas especies de *Bacillus* producen enzimas hidrolíticas policelulares que se encargan de degradar los compuestos que están disponibles en el suelo como son polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, lo que permite a estas bacterias usar dichos productos como fuente de carbono y donadores de electrones. Una de las enzimas más conocidas que secretan las especies de *Bacillus* es la amilasa, enzima encargada principalmente de degradar el almidón y convertirlo en dextrina. La principal bacteria que secreta esta enzima es *B. subtilis*, utilizado en gran cantidad para producir esta enzima y obtenerla mas fácilmente (Starr, 1981. Holt *et. al.*, 1984. Schlegel, 1997).

Otra utilidad que se le atribuye a las bacterias del género *Bacillus* es en la agricultura, por ejemplo *Bacillus thuringiensis*, el cual forma un cuerpo paraesporal o cristal de proteína, conocido como delta-endotoxina, que se forman durante la esporulación y tienen actividad tóxica para larvas de insectos tales como Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros (Sánchez-Yañez, 2004).

En la Décima Región de Chile existen una gran variedad de bosques, entre otros, bosques de *Eucayptus globulus labill*, *Pseudotsuga menziesii*, *Populus nigra*, *Nothofagus obliqua* y de *Pinus radiata* (CONAF, 2001). Los bosques de *P. radiata* fueron introducidos en nuestro país en 1885, con fines exclusivamente ornamentales, pero tal vez debido a su gran adaptabilidad a las más diversas condiciones ambientales, actualmente son la base de la industria forestal en Chile, siendo el tercero en el ranking de productos chilenos de exportación (Lisboa, 1993). A nivel nacional ocupan una superficie de 1.446.414 Ha que corresponde al 60,11% del total de las plantaciones en Chile y en la Décima Región abarcan 117.496 Ha que corresponde al 64% del total de todas las plantaciones de la Región (Instituto Forestal de Chile, 2003).

Los suelos utilizados para el cultivo de *Pinus radiata* son muy difíciles de volver a utilizar con fines agrícolas, debido a que los ácidos que excreta esta especie deshidrata el suelo y lo deja muy poco fértil. Otra consecuencia es que la misma acidez que presentan estos árboles no permite el crecimiento del sotobosque, como tampoco la existencia de una alta densidad de organismos y microorganismos que pueden encontrarse en una pradera, que posee sólo gramíneas y arbustos, donde el suelo es mas favorable para el crecimiento de cualquier otro tipo de vegetación o microorganismo (Olivares *et. al.*, 1992).

El suelo constituye un gran reservorio de microorganismos, dentro de los cuales existen microfloras que son zimógenas, abarcando a todos los microorganismos saprófitos y parásitos, siendo el suelo solo un medio en donde vegetan a la espera de encontrar mejores condiciones de vida. Por otro lado, existe la microflora autóctona, que abarca a todos los microorganismos heterótrofos y autótrofos, cuyo papel es fundamental para completar los dos grandes ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno. (Girard *et. al.,* 1964).

Las bacterias son los organismos más numerosos en el suelo (entre 10^6 y 10^7 bacterias/gramo de suelo), las actividades en que participan los microorganismos del suelo son la fijación de nitrógeno, degradación de celulosa, el ciclo del carbono, del nitrógeno, incorporación de fósforo a la planta, interacción con otros microorganismos y control biológico. (Repetto, 2005).

Dentro de los géneros más comunes que podemos encontrar en los suelos tenemos bacterias nitrificantes, amonificantes, que hidrolizan urea, utilizan celulosa y bacterias que descomponen las proteínas. Entre los géneros más representativos tenemos *Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthropbacter, Bacillus, Brevibacterium, Caulobacter, Cellulomonas, Clostridium, Corynebacterium, Metallogenium, Micrococcus, Mycobacterium, Pedomicrobium, Pseudomonas, Sarcinas, Staphylococcus, Streptococcus y Xanthomonas.* (Alexander, 1980).

En base a los antecedentes antes mencionados, y debido a que bacterias pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de formar estructura de resistencia para poder soportar condiciones adversas y por ende son capaces de colonizar variados sustratos, independiente de las condiciones que se den para su desarrollo, se enuncia la siguiente hipótesis:

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Cualitativamente no existen diferencias entre las especies del género *Bacillus* de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General.

Determinar taxonómicamente las bacterias del género *Bacillus* presente en los suelos de un bosque de *Pinus radiata* y de una pradera permanente, en distintas épocas del año.

2.2.2 Objetivos Específicos.

- Aislar cepas de *Bacillus* desde un suelo de bosque de *P. radiata* y un suelo de pradera permanente.
- Determinar taxonómicamente las cepas de *Bacillus* aisladas desde un suelo de bosque de *P. radiata* y un suelo de pradera permanente.
- Relacionar las especies del género *Bacillus* con la época de recolección de muestras desde los suelos de un bosque de *P. radiata* y una pradera permanente.
- Relacionar los factores climáticos: temperatura y humedad con las poblaciones de *Bacillus* aisladas desde ambos suelos muestreados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico.

Cepas Bacterianas del Género *Bacillus*, obtenidas de los sectores de muestreo en las distintas épocas de recolección.

3.1.2 Reactivos.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar citrato de Simmons, agar Nitrato, agar peptona al 2 %, almidón, caldo glucosado y caldo peptona.

Reactivos: azul de bromotimol, reactivo de Barrit (solución A y solución B), reactivo rojo metilo, reactivo nitrato (solución A y solución B)

Agentes de tinción: safranina 0,25 %, verde de malaquita 7,6%, violeta de Genciana.

Otros: Agar- agar, agua oxigenada, agua destilada estéril, alcohol, alcohol acético, cloruro de sodio (NaCl), extracto de carne, extracto de tierra, Gas pack, hidratos de carbono (glucosa, xilosa, manitol, arabinosa), lugol peptona, solución de oligoelementos y solución salina estándar, yodo y yoduro de potasio.

3.1.3 Equipos.

Autoclave Orsa, balanza analítica Precisa 2200C, Baño María Memmert, cámara de cultivo J. Kottermann, cámara de cultivo Merck para anaerobiosis, cámara fría Eurofrigo, cocinilla a gas Indugas, microscopio Carl Zeiss, microonda LG modelo Interlowave, refrigerador Trotter, cámara UV y horno Pasteur.

3.1.4 Otros.

Aceite de inmersión, algodón, asa de siembra, botellas de vidrio de 500 mL, botellas plásticas de 600 mL, elásticos, embudos, espátula de metal, gradillas de metal, gasa, horquilla de alambre, mecheros, olla a presión, papel filtro, pastillas efervescentes, pipetas Pasteur, pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 mL, placas Petri, plumón permanente, portaobjetos, probetas de 500 mL y 2000 mL, toallas de papel, tubos con casquete y tubos de ensayo, vasos precipitados de 200 mL y 1000 mL y velas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Recolección de muestras de suelo.

Las muestras de suelo se recolectaron desde un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente, ambas ubicadas a 19 km a la salida sur de Valdivia. Cada muestreo coincidió con el término de la estación del año, el primer muestreo se realizó el 13 de junio, el segundo el 13 de septiembre y el tercero el 13 de diciembre del 2005. Para la recolección de las muestras, tanto en el bosque de *Pinus* como en pradera se delimitó un área de estudio de 3 hectáreas, donde se extrajeron 5 muestras de suelo, a una profundidad de 0 a 10 cm. Cada muestra de suelo fue de 50

g. En total en cada estación del año de muestreo se recolectaron 30 muestras, 15 de suelo de bosque de *Pinus* y 15 de pradera. Las muestras de suelo se depositaron independientemente en bolsas plásticas las cuales se rotularon de acuerdo al lugar de recolección. Luego las muestras se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad Austral de Chile y fueron analizados inmediatamente. Las 5 muestras recolectadas de cada sector de estudio y época de muestreo se mezclaron y homogeneizaron, obteniéndose una muestra única. De ésta, se extrajo 1 g y se depositó en un tubo, que contenía 10 mL de agua destilada estéril y otro gramo de muestra se depositó en otro tubo que contenía 10 mL de caldo peptona. Los tubos se depositaron en un Baño María a una temperatura no superior de 80°C por 30 minutos, luego se retiraron y depositaron en una cámara de cultivo a 23°C $\pm$ 2°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron los tubos y se realizaron diluciones seriadas. Cada dilución (0,1 mL) se sembró por triplicado mediante el método de siembra por rastrillo en una placa Petri que contenía agar peptona al 2%. Luego las placas se incubaron a 23°C $\pm$ 2°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se rescataron las colonias más aisladas y se sembraron en tubos que contenían agar peptona al 2% inclinado.

Para determinar la humedad presente en el lugar de muestreo, se pesó 1 gramo de cada suelo obteniendo el peso fresco (PF), luego las muestras se secaron en la estufa de secado a 60 ^{0}C hasta la obtención de peso seco (PS) constante.

Los tubos sembrados se incubaron en una cámara de cultivo a 23°C $\pm$ 2°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se extrajo un pequeño inóculo y se extendió en un portaobjeto para realizar la tinción de Wirtz y observar la presencia de endosporas bacterianas.

Tinción de Wirtz:

Esta tinción permitió observar la presencia de endosporas bacterianas, ya que los constituyentes de esta estructura retienen fuertemente el colorante verde de malaquita al 7.6% tomando un color verde, y posteriormente se tiñe con safranina al 0,25% para que de un contraste a la célula bacteriana (Valenzuela, 2003).

Un inóculo de la muestra se extendió en un portaobjeto con la ayuda de un asa de siembra y se pasó 20 veces por la flama de un mechero para fijarla en el portaobjeto, luego la preparación se depositó en una horquilla de alambre para proceder a teñir con verde de malaquita al 7.6% por 8 minutos, posteriormente se lavaron con agua por unos 15 segundos, se agregó zafranina al 0.25% por 15 segundos, después se lavaron con agua y se procedió a secar la muestra teñida. Las preparaciones fijadas y teñidas permitieron ver la presencia de endosporas y agrupar los *Bacillus* según la forma y posición de la endospora dentro de la célula madre bacteriana.

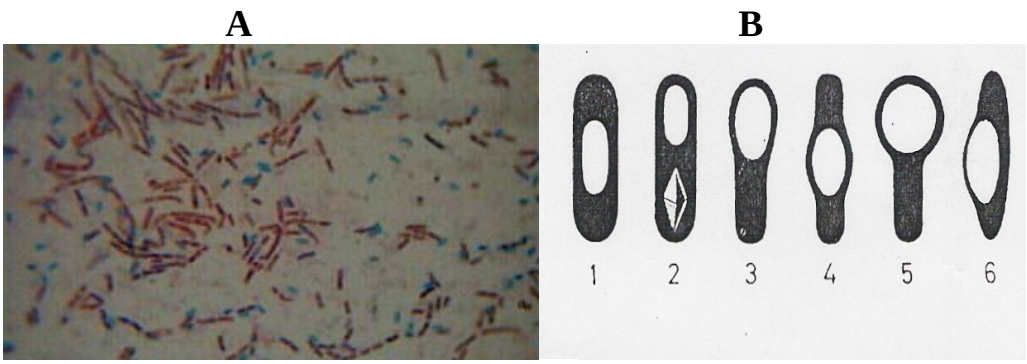

Figura 1: A: muestra de *Bacillus* con tinción de Wirtz a un aumento de 100X. **B:** tipos de esporas presentes al interior del cuerpo de la bacteria del género *Bacillus*, 1) espora central; 2) espora Terminal; 3) espora terminal con hinchazón de la célula madre; 4) espora central con hinchazón de célula madre; 5) espora terminal redonda, con hinchazón de la célula madre y 6) espora lateral. (extraído de Schlegel, 1997).

Una vez que se obtuvieron 50 cepas bacterianas de suelo de bosque de *Pinus* y 50 cepas bacterianas desde suelo de pradera, se procedió a realizar la taxonomía bacteriana, esto se realizó mediante las claves extraídas de los manuales de Bergey´s (1974, 1984 y 2000) y en tesis de pregrado de Bastias (1981) realizando las pruebas bioquímicas mencionadas ahí, tales como: catalasa, prueba de reducción de nitratos, Voges Proskauer, citrato, reducción de azucares tales como glucosa, manitol, xylosa, arabinosa y almidón, forma de las colonias y observándose además el crecimiento en anaerobiosis (Gas-Pack).

Tinción de Gram:

Esta tinción permite ver si las bacterias en estudio pertenecen a bacterias Gram positivas o negativas. Para esto se utilizó: violeta de genciana, lugol, alcohol acetona y safranina o fucsina de Gram (Valenzuela, 2003).

Un inóculo de la muestra se extendió en un portaobjeto con la ayuda de un asa de siembra y se fijó con la flama del mechero. Posteriormente la muestra se depositó en una horquilla de alambre para agregar violeta de genciana por un minuto, a continuación se lavó con abundante agua y se agregó lugol por un minuto, este último cumple la función de mordiente. Posteriormente se lavó con abundante agua y se agregó alcohol acetona por 15 segundos, se volvió a lavar y se agregó fucsina Gram o safranina por 30 segundos. Una vez pasado el tiempo se lavó con agua y se procedió al secado de la muestra en la flama del mechero.

Las preparaciones fijadas y teñidas se observaron al microscopio con un aumento de 100X para su clasificación en Gram positivas (color violeta) o negativas (color rosado o rojo), dejando

solo las Gram positivas ya que esa es una condición que presentan las bacterias del género a estudiar.

Prueba de la catalasa:

La catalasa es una enzima que tienen la mayoría de las bacterias, cuya función es catalizar la ruptura del agua oxigenada, liberando oxígeno al ambiente (Valenzuela, 2003).

Para esta prueba se tomó un portaobjeto y se depositó un inóculo de las bacterias a examinar, sobre éstas se depositó una gota de agua oxigenada, la reacción es positiva si existe liberación de burbujas. Generalmente esta prueba es positiva para el género *Bacillus.*

Prueba de reducción de nitratos:

Esta es una reacción que pueden llevar a cabo los microorganismos anaerobios facultativos, formando compuestos tales como nitritos, amoníaco y óxido nitroso (Valenzuela, 2003).

Para esta prueba se debió sembrar por picadura un inóculo de la bacteria en estudio en agar nitrato, las cuales se incubaron a 23°C $\pm$ 2°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se agregó 0.5 mL de la solución A (0,8 g. ácido sulfanílico en 100 mL ácido acético 5N) y B (0,5 g. alfa naftilamina en 100 mL ácido acético 5N) del reactivo nitrato. La reacción es positiva si el contenido del tubo se torna de color violeta o café ladrillo.

Prueba de Voges Proskauer:

Con esta prueba es posible observar si la bacteria en estudio realiza una fermentación fórmica de tipo butilenglicol o llamada de tipo Aerógenes (Valenzuela, 2003).

Un inóculo de la bacteria en estudio se sembró en tubos que contenían caldo glucosado, tras lo cual se incubaron a 23°C ± 2°C por 24 horas, luego se agregó a cada tubo el reactivo de Barrit, 0.5 mL de la solución A (naftol al 5% diluido en alcohol etílico 95%) y 0.2 mL de la solución B (KOH al 40%). Se esperaron 10 minutos para ver si la reacción es o no positiva, si el contenido del tubo se torna color rosado, la reacción es considerada positiva.

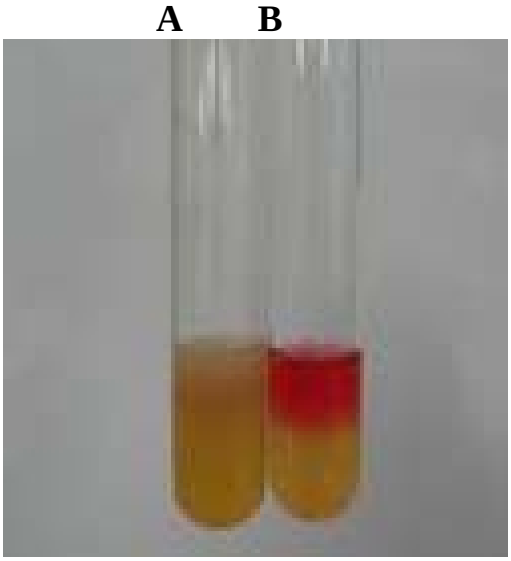

Figura 2: Prueba de Voges Proskauer, **A:** reacción negativa. **B:** reacción positiva

Prueba del Citrato:

Permite determinar si la bacteria es capaz de utilizar el citrato como única fuente de energía y carbono (Valenzuela, 2003).

Se sembró un inóculo de la cepa bacteriana a estudiar en tubos que contenían agar citrato Simmon inclinado, se dejaron incubar a 23°C ± 2°C por 24 horas. La reacción es positiva si el medio de cultivo cambia del color verde original a azul.

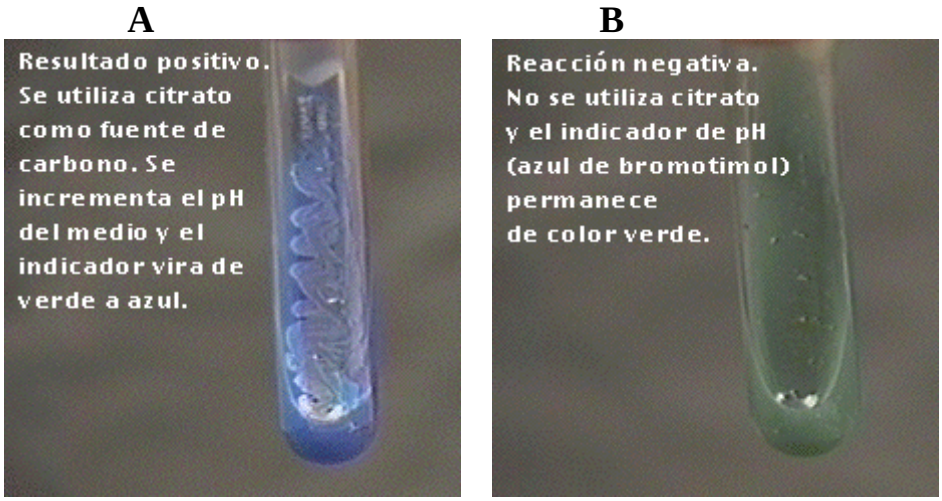

Figura 3: Prueba de Citrato: **A:** reacción positiva (coloración azul). **B:** reacción negativa (coloración verde).

Forma de las colonias:

Las cepas bacterianas fueron sembradas en placas petri que contenían agar peptona al 2%. Se depositó un pequeño inóculo en el agar y de procedió a incubar por 24 horas a 23 ± 2°C. Transcurrido el tiempo se observó a ojo desnudo las formas de las colonias, elevación, margen, superficie, consistencia, pigmento y características ópticas.

Crecimiento en anaerobiosis:

Para esta prueba se utilizó la técnica Gas-Pack. Para esto se debió depositar los tubos que contenían agar peptona al 2% inclinado con las bacterias sembradas en una cámara de anaerobiosis, a la cual se le agregó el sobre de Gas-Pack, y se sello herméticamente, depositándose en la cámara de cultivo para encubar a 23°C ± 2°C por 24 horas. Trascurrido el periodo de incubación se observó si existía crecimiento. La prueba se consideró como positiva si había crecimiento de colonias bacterianas en el interior de los tubos.

Utilización de almidón:

El resultado de esta prueba permite observar si la cepa bacteriana en estudio es capaz de utilizar el almidón, secretando amilasas para la degradación de éste (Valenzuela, 2003).

La cepa bacteriana se sembró en solución almidón que se encontraba en tubos Venojet (receta en anexos), posteriormente se incubaron a 23ºC ± 2ºC por 10 días, pasado el tiempo de incubación agregó al interior del tubo solución de yodo para ver si la reacción era positiva (color yodo) o negativa (color azul o violeta).

Hidrólisis de hidratos de carbono:

En esta prueba se utilizaron distintos azucares: glucosa, manitol, arabinosa y xilosa, para determinar cual era capaz de utilizar la bacteria (Valenzuela, 2003).

Para esto se sembró la cepa bacteriana en estudio, en cada uno de los azúcares mencionadas anteriormente, durante 24 a 48 horas a 23ºC $\pm$ 2ºC. Reacción positiva se denota por un cambio de color de verde a amarillo y negativa se mantiene el color original del medio.

Finalmente se midió la temperatura a ambos suelos muestreados, en cada una de las épocas de muestreo.

4. RESULTADOS

Se recolectaron 300 cepas bacterianas en ambos suelos muestreados, 150 cepas en bosque de *P. radiata* y 150 cepas en suelo de pradera permanente.

La taxonomía realiza en el presente estudio es tentativa, debido a que se deberían realizar una mayor cantidad de pruebas bioquímicas, ocupar otras técnicas de microscopia y análisis moleculares, para tener una absoluta certeza de las especies descritas.

4.1 Taxonomía de bacterias aisladas en suelo de bosque de *P. radiata.*

Del total de cepas aisladas (150), que fueron recolectadas en suelos de un bosque de *P. radiata* de los tres muestreos realizados, de acuerdo a los test bioquímicas realizados y a las claves de los Manuales de Bergey´s, probablemente se determinaron un total de 11 especies: *B. subtilis var. niger, B. firmus, B. subtilis, B. cereus, B. laterosporus, B. pumilus, B. licheniformis, B. sphaericus, B. coagulans, B. megaterium* y *B. stearothermophilus.*

En las Figuras 4, 5 y 6, se muestra la distribución porcentual de probables taxas de bacterias recolectadas en un suelo de bosque de *P. radiata* en cada una de las épocas de muestreo.

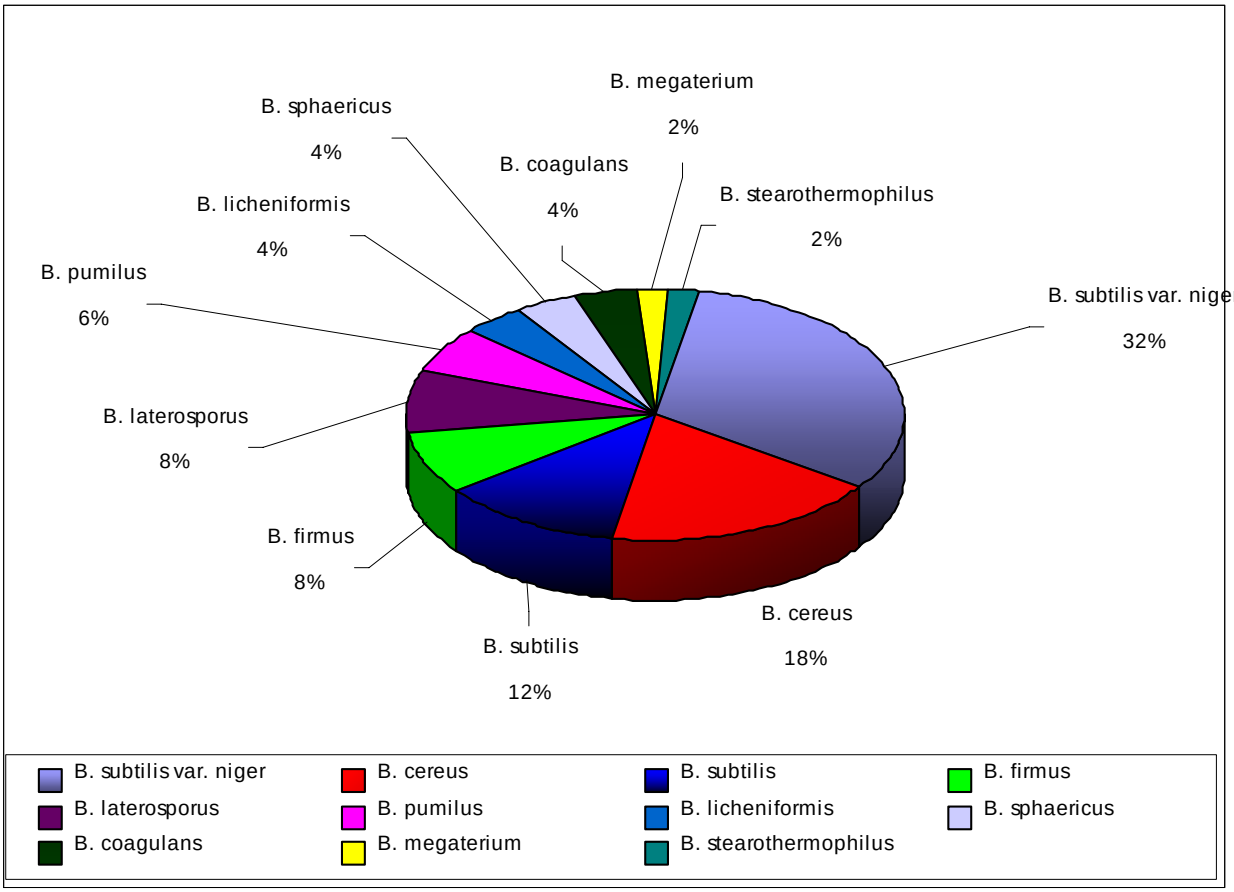

Figura 4: Distribución porcentual de bacterias recolectadas en otoño, en muestras de suelo de bosque de *P. radiata*.

Se muestra las distintas de especies probables del género *Bacillus* presentes en suelos de bosque de *P. radiata* recolectadas en la época de otoño, dentro de este muestreo se recolectaron 11 especies. En el gráfico se puede visualizar los distintos porcentajes en que se encontró cada especie posible de este género, como se puede observar la especie que predominó es *B. subtilis var. niger* (32%) y las de menor porcentaje fueron *B. megaterium* y *B. stearothermophilus* (ambas con un 2%).

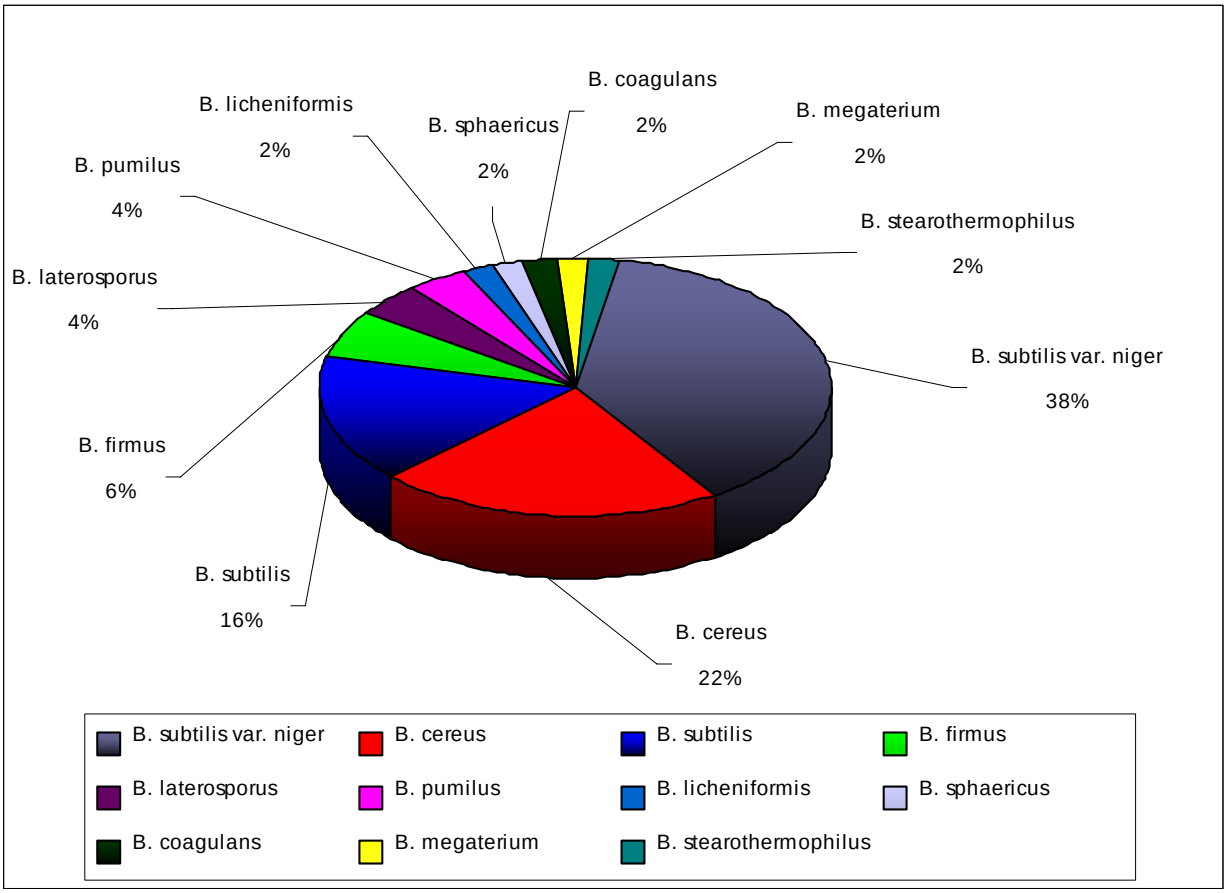

Figura 5: Distribución porcentual de bacterias recolectadas en invierno, en muestras de suelo de bosque de *P. radiata*.

Se observan las distintas especies posibles del género *Bacillus* presentes en suelos de bosque de *P. radiata* recolectadas en la época de invierno, donde se recolectaron 11 especies. En el gráfico se pueden visualizar los porcentajes en que se encontraron las distintas especies donde predominó *B. subtilis var. niger* (38%) y en menor porcentaje se encontraron *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B coagulans*, *B. sphaericus* y *B. licheniformis* (todas con un 2%).

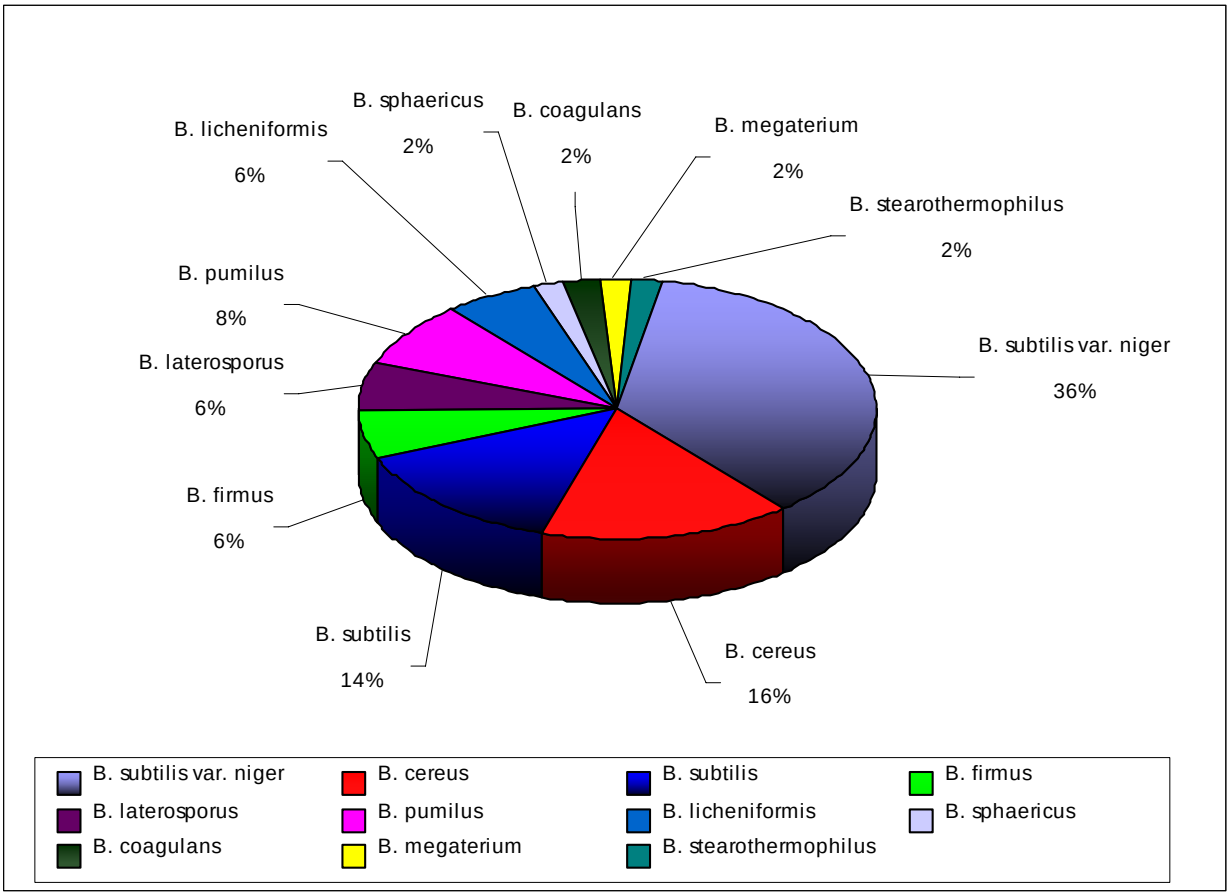

Figura 6: Distribución porcentual de bacterias recolectadas en primavera en muestras de suelo de bosque de *P. radiata*.

Se muestra las distintas especies posibles del género *Bacillus* presentes en suelos de bosque de *P. radiata* recolectadas en la época de primavera, de las que se recolectaron 11 especies. En el gráfico se puede observar los distintos porcentajes en que se encontró cada especie, se observa la especie que predominó *B. subtilis var. niger* (36%) y en menor porcentaje se encontraron *B. megaterium, B. stearothermophilus, B coagulans* y *B. sphaericus* (todas con un 2%).

El mayor porcentaje poblacional correspondió a la probable especie *B. subtilis var. niger* (38%) correspondiente al muestreo de invierno (Fig. 5) y el menor a *B. megaterium* y *B. stearothermophilus* (2%), en los 3 muestreos (Figs. 4, 5 y 6).

En cuanto a la diversidad de taxas, durante todos los muestreos se registraron las mismas potenciales especies, solo que cambiaron los porcentajes de recolección. Las especie que aumentaron en los muestreos de invierno fueron *B. subtilis var. niger, B. firmus* y *B. subtilis* llegando casi al 38% en el caso de *B. subtilis var. niger* (Fig. 5).

4.2 Taxonomía de bacterias aisladas en suelo de pradera permanente.

Del total de cepas aisladas (150), que fueron recolectadas en suelo de una pradera permanente en los tres muestreos realizados, se determinaron un total de 13 factibles especie: *B. cereus, B. laterosporus, B. subtilis var. niger, B. pumilus, B. licheniformis, B. alvei, B. subtilis, B. cereus var. mycoide, B. firmus, B sphaericus, B. brevis, B. circulans* y *B. coagulans*.

En las Figuras 7, 8 y 9, se muestra la distribución porcentual de las taxas de bacterias recolectadas en suelos de pradera permanente en las distintas épocas de muestreo.

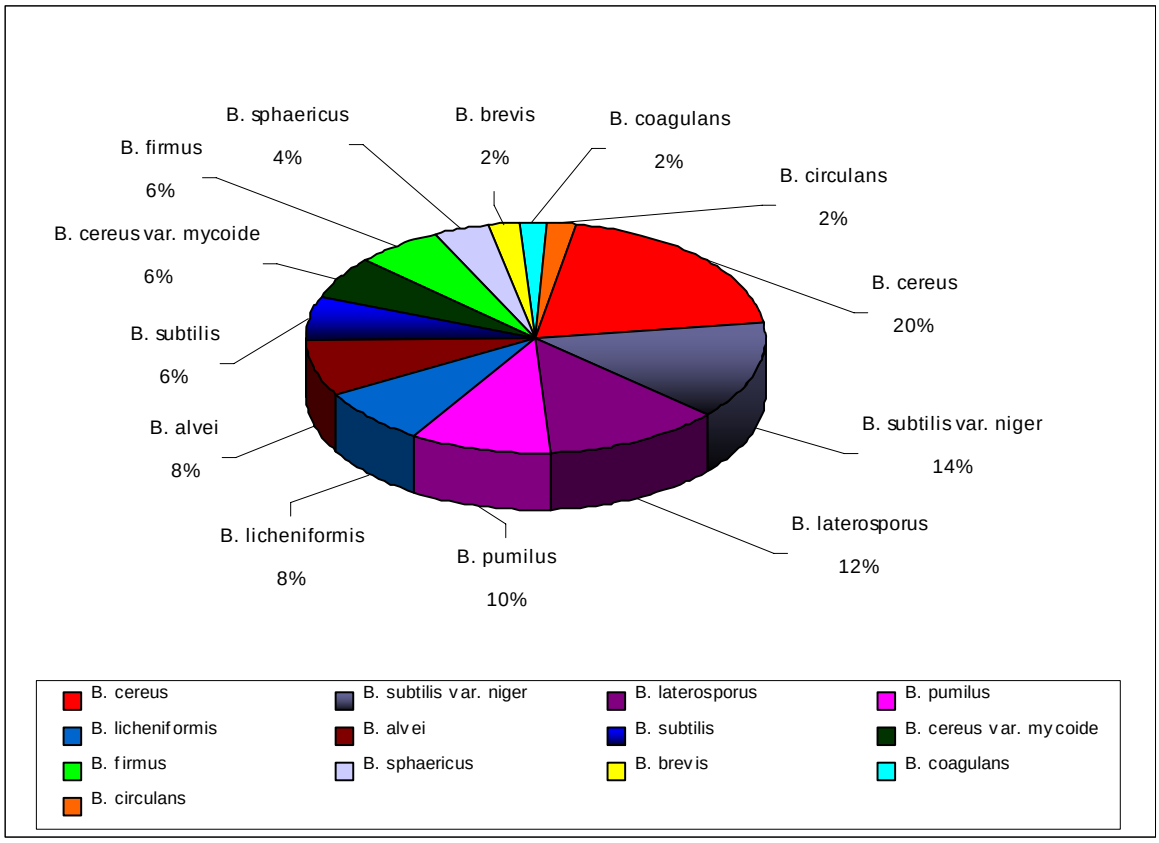

Figura 7: Distribución porcentual de bacterias recolectadas en otoño, en muestras de suelo de pradera permanente.

Se muestran las distintas especies del género *Bacillus* presentes en suelos de una pradera permanente recolectadas en la época de otoño, dentro de este muestreo se recolectaron 13 presumibles especies. En el gráfico se pueden visualizar los distintos porcentajes en que se encontraron cada una de las posibles especies del género, como se puede observar la especie que predominó fue *B. cereus* (20%) y el de menor porcentaje fue para *B coagulans* y *B. circulans* y *B. brevis* con un 2%.

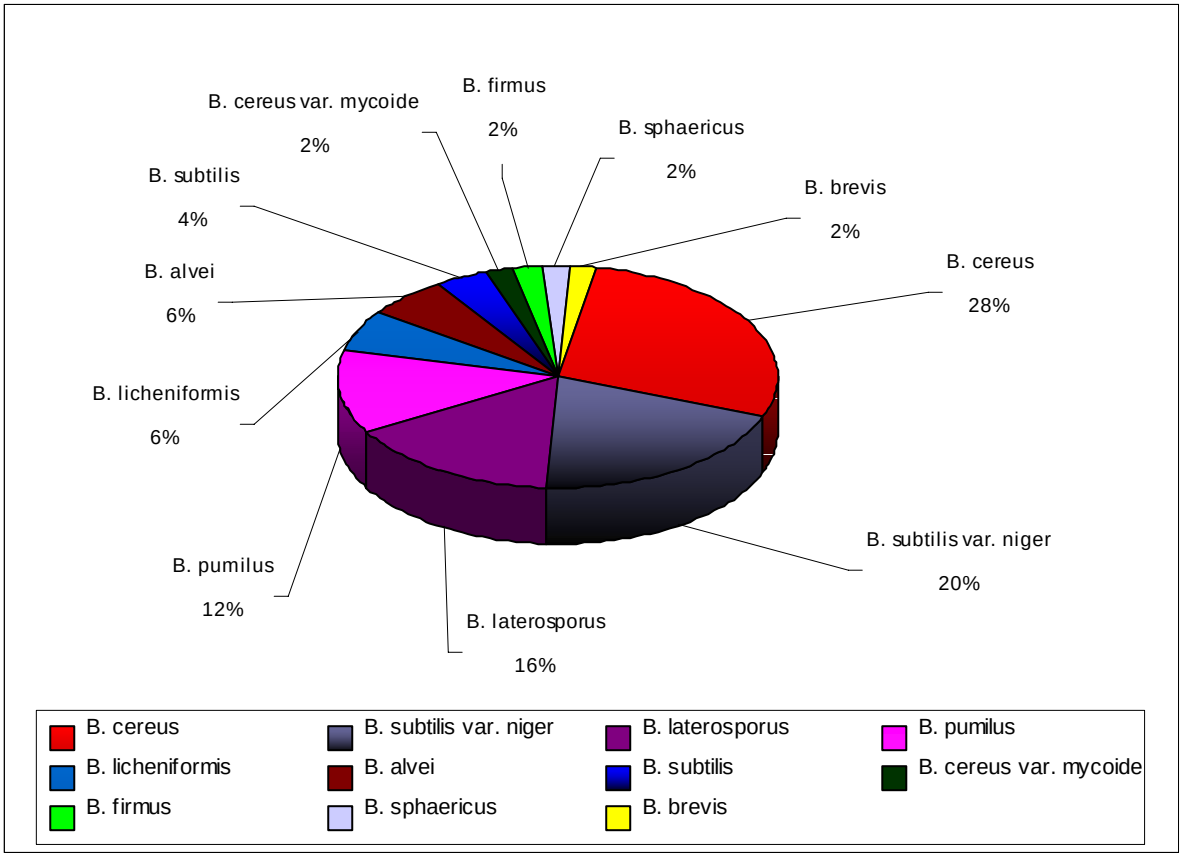

Figura 8: Distribución porcentual de bacterias recolectadas en invierno, en muestras de suelo de pradera permanente.

Se muestra las distintas especies del género *Bacillus* presentes en suelos de una pradera permanente recolectadas en la época de invierno, dentro de este muestreo se recolectaron 11 presumibles especies. El gráfico nos permite observar los porcentajes en que se encontraron las especies bacterianas, predominó *B. cereus* (28%) y *B. brevis, B. sphaericus, B. firmus* y *B. cereus var. mycoide* se observaron en menor porcentaje con un 2%.

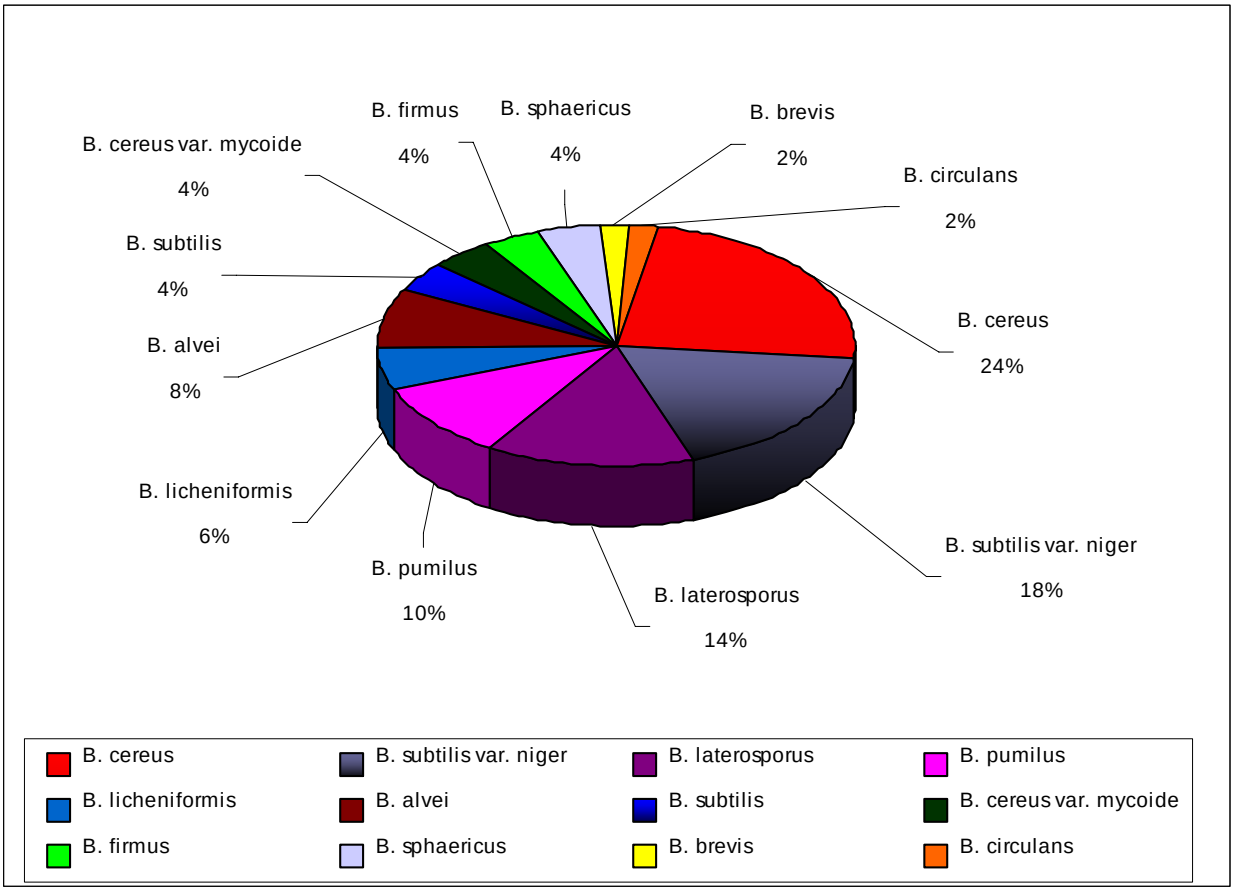

Figura 9: Distribución porcentual de bacterias recolectadas en primavera, en muestras de suelo de pradera permanente.

Se muestran las distintas especies del género *Bacillus* presentes en suelos de una pradera permanente recolectadas en la época de primavera, dentro de este muestreo se recolectaron 12 probables especies de este género. En el gráfico se puede visualizar los distintos porcentajes en que se presentaron cada una de las especies, como se puede observar la especie que predominó fue *B. cereus* (24%) y las de menor porcentaje fueron *B. brevis* y *B. circulans* (ambas con un 2%).

El mayor porcentaje poblacional correspondió a la especie *B. cereus* (28%) durante el muestreo de invierno (Fig. 8) y el menor a *B. brevis* (2%), correspondiente a los muestreos de invierno y primavera (Figs. 8 y 9).

En cuanto a la diversidad de taxas, durante todos los muestreos el 85% de las presumibles especies fueron las mismas. *B. coagulans* sólo se aisló en el muestreo de otoño (Fig. 7) y *B. circulans* sólo se obtuvo en los muestreos de otoño y primavera (Figs. 7 y 9).

Las posibles especies que dominaron en cada muestreo tienden a aumentar su número en el muestreo de invierno y las especies de menor porcentaje tendieron a disminuir en la misma estación. Esto lo podemos observar en la Figura 5 y 8 de cada sector de muestreo (suelo de bosque de *P. radiata* y suelo de pradera permanente).

4.3 Comparación de las especies del género *Bacillus* con la época de recolección de muestras desde los suelos de bosque de *P. radiata* y pradera permanente.

En las Figuras 10, 11 y 12 se muestran las probables especies de bacterias del género *Bacillus* aisladas desde suelo de bosque de *P. radiata* y de suelo de pradera permanente en cada época de muestreo (300 cepas), es decir, se comparan las mismas especies encontradas (9) en ambos sectores muestreados.

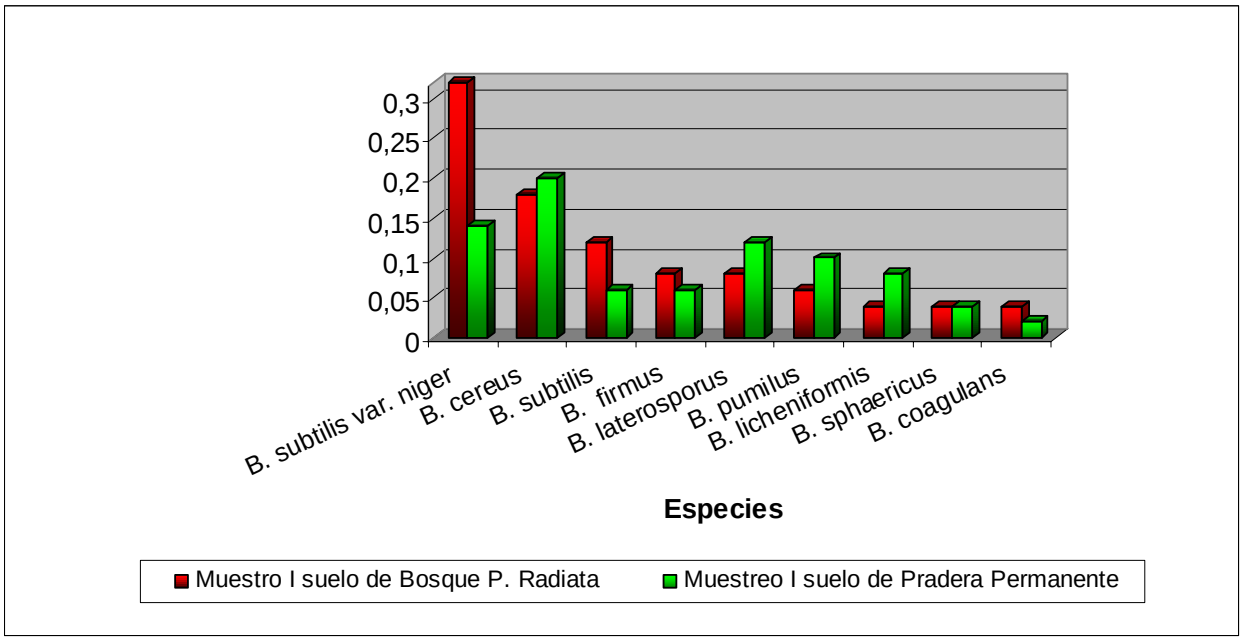

Figura 10: Comparación de especies de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de pradera permanente y bosque de *P. radiata*, muestreo de otoño.

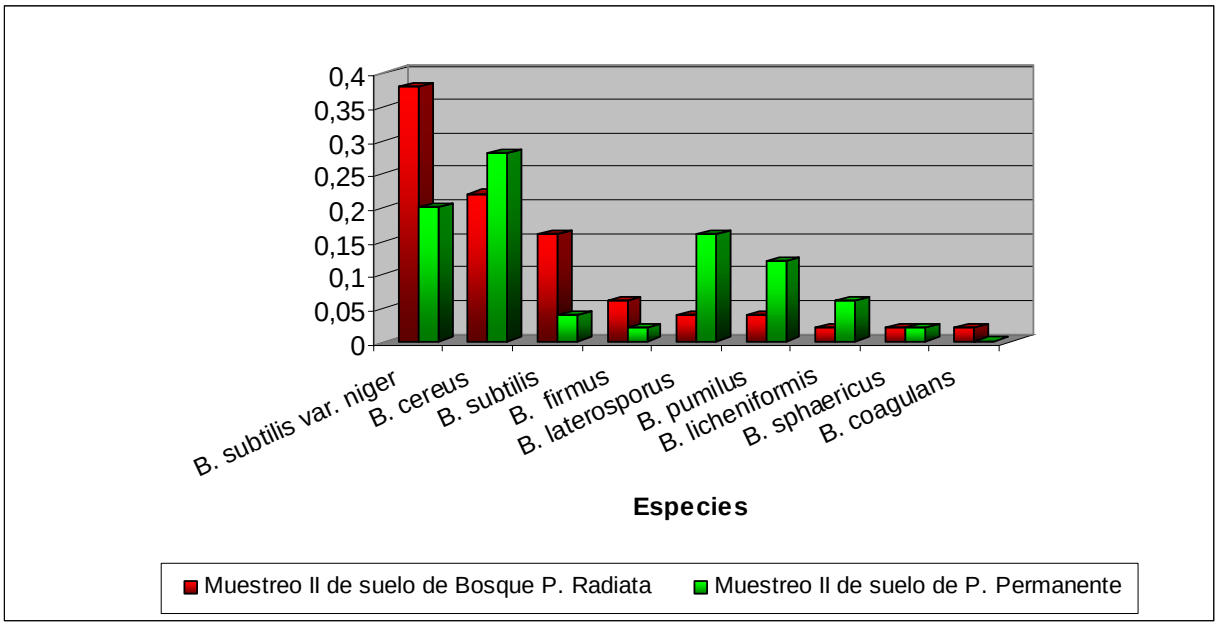

Figura 11: Comparación de especies de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de pradera permanente y bosque de *P. radiata*, muestreo de invierno

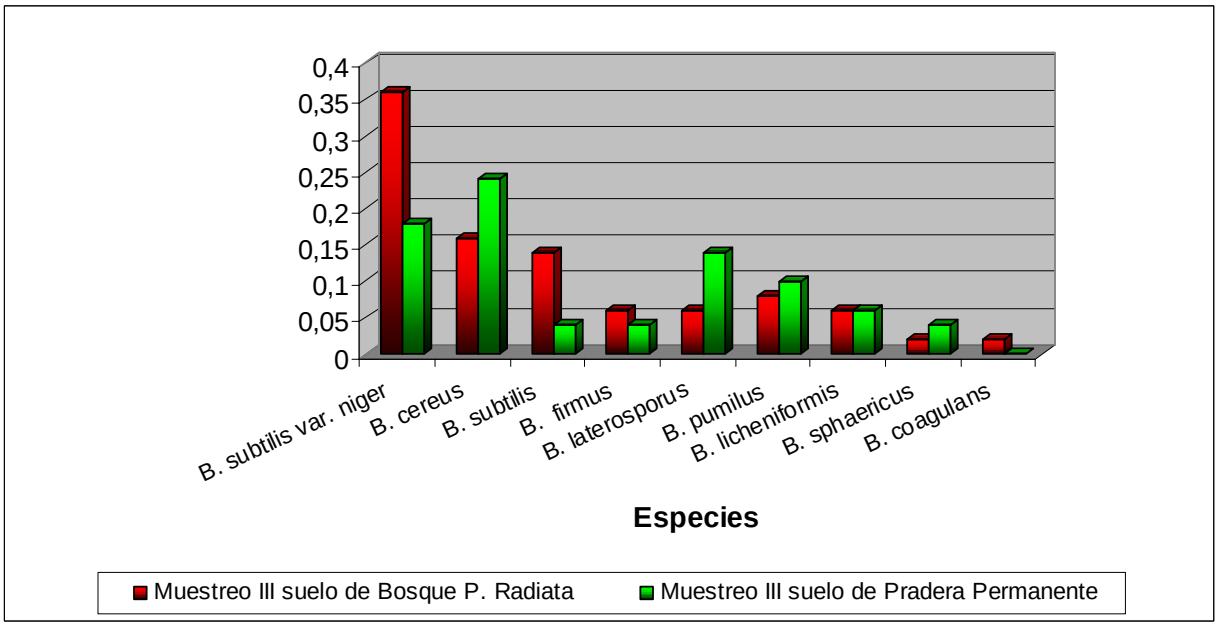

Figura 12: Comparación de especies de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de pradera permanente y bosque de *P. radiata*, muestreo de primavera.

Dentro de cada muestreo se recolectaron las mismas probables especies de bacterias del género *Bacillus* dentro del mismo tipo de suelo (con excepción de *B. coagulans* y *B. circulans* en suelos de pradera permanente, Fig. 7 y 8 respectivamente). Pero a su vez en distintos tipos de suelos tanto en pradera como en bosque de *P. radiata*, también se encontraron los mismos tipos de bacterias que se describieron en los gráficos anteriores, tales como *B. subtilis var. niger, B. cereus, B. subtilis, B. firmus, B. laterosporus, B. pumilus, B. lecheniformis, B. sphaericus* y *B. coagulans*. Estas especies (9) se encontraron en ambos suelos muestreados pero con distintos porcentajes de individuos dependiendo del suelo estudiado.

Por lo descrito anteriormente podemos señalar, que iguales especies de bacterias del género *Bacillus* se pueden encontrar en ambos suelos muestreados debido a que sus estructuras de resistencias les permiten soportar distintas condiciones.

Cabe mencionar que las probables especies *B. alvei, B. brevis, B. cereus var. mycoide* y *B. circulans* se aislaron sólo en suelos de pradera permanente (Figs. 7, 8 y 9) y *B. megaterium* con *B. stearothermophilus* sólo en suelo de bosque de *P. radiata* (Figs. 4, 5 y 6).

Dentro de las factibles especies de bacterias que presentaron un menor porcentaje fueron *B. subtilis var. niger* (38%) y *B. cereus* (28%, Fig. 11). Las de menor porcentaje fueron *B. sphaericus* (promedio de 2.7%, Fig. 11) y *B. coagulans* (con un promedio de 0.67%) en suelos de pradera permanente, en la época de invierno.

4.4 Poblaciones bacterianas del género *Bacillus* aisladas de suelo de bosque de *Pinus radiata* de acuerdo a su relación con parámetros físicos.

En las Figuras 13 y 14, se observan las variaciones de las posibles poblaciones bacterianas del género *Bacillus* aisladas de suelos de bosque de *P. radiata*, para cada época de muestreo, de acuerdo a la temperatura (Fig. 13) y humedad (Fig. 14).

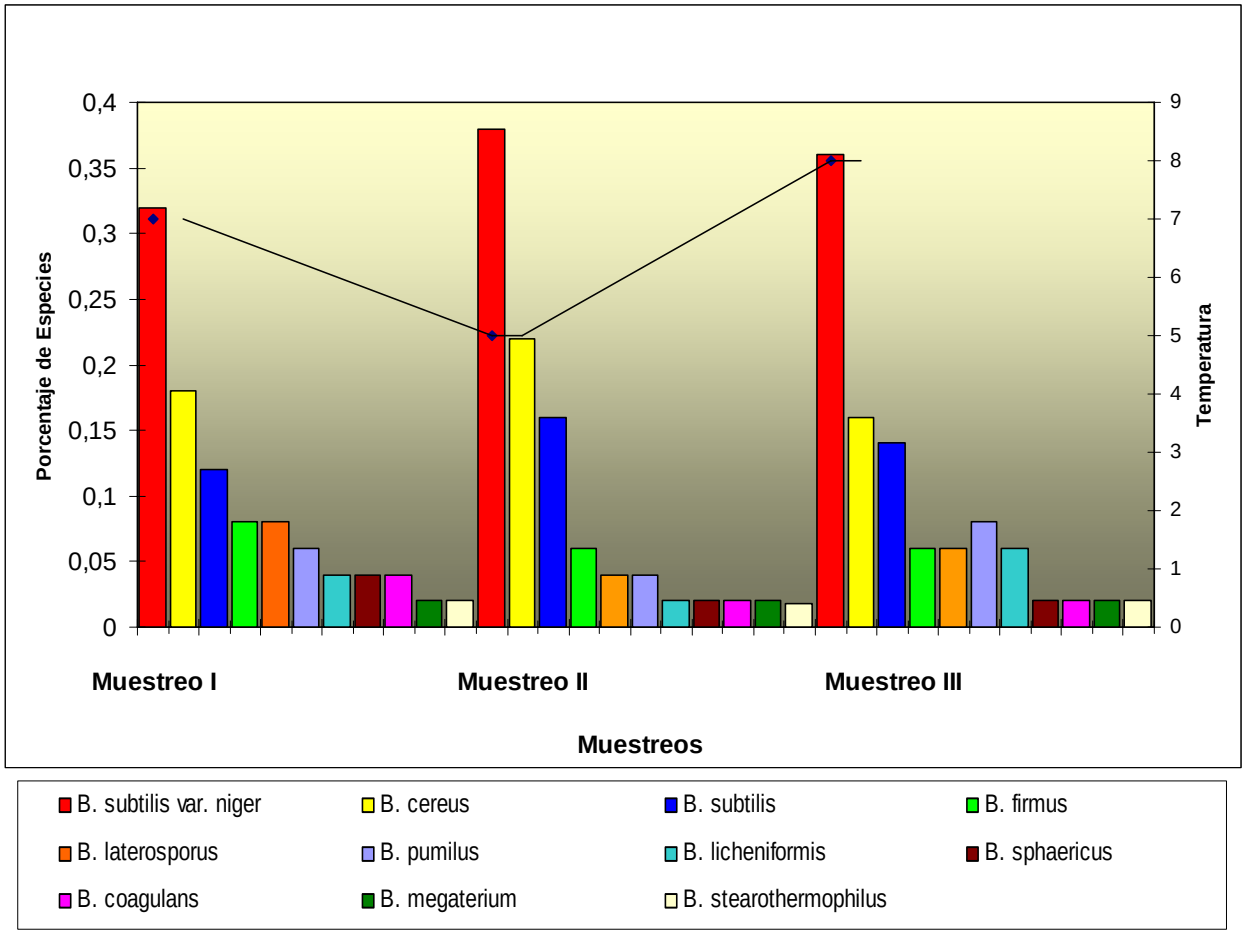

Figura 13: Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de bosque de *P. radiata* de acuerdo a la temperatura.

En la Figura 13 se muestra la variación de temperatura del suelo del lugar de muestreo registrada durante las épocas de recolección versus las poblaciones de especies del género *Bacillus*. Como se observa, la mayor temperatura (8ºC) se registró en primavera la cual tiene directa relación con una disminución de las cepas que presentaron un alto porcentaje y un leve aumento en las de menor. La menor temperatura (5ºC) se registró en invierno donde se relaciona un aumento en las especies que tienen mayor porcentaje y una disminución en las que no.

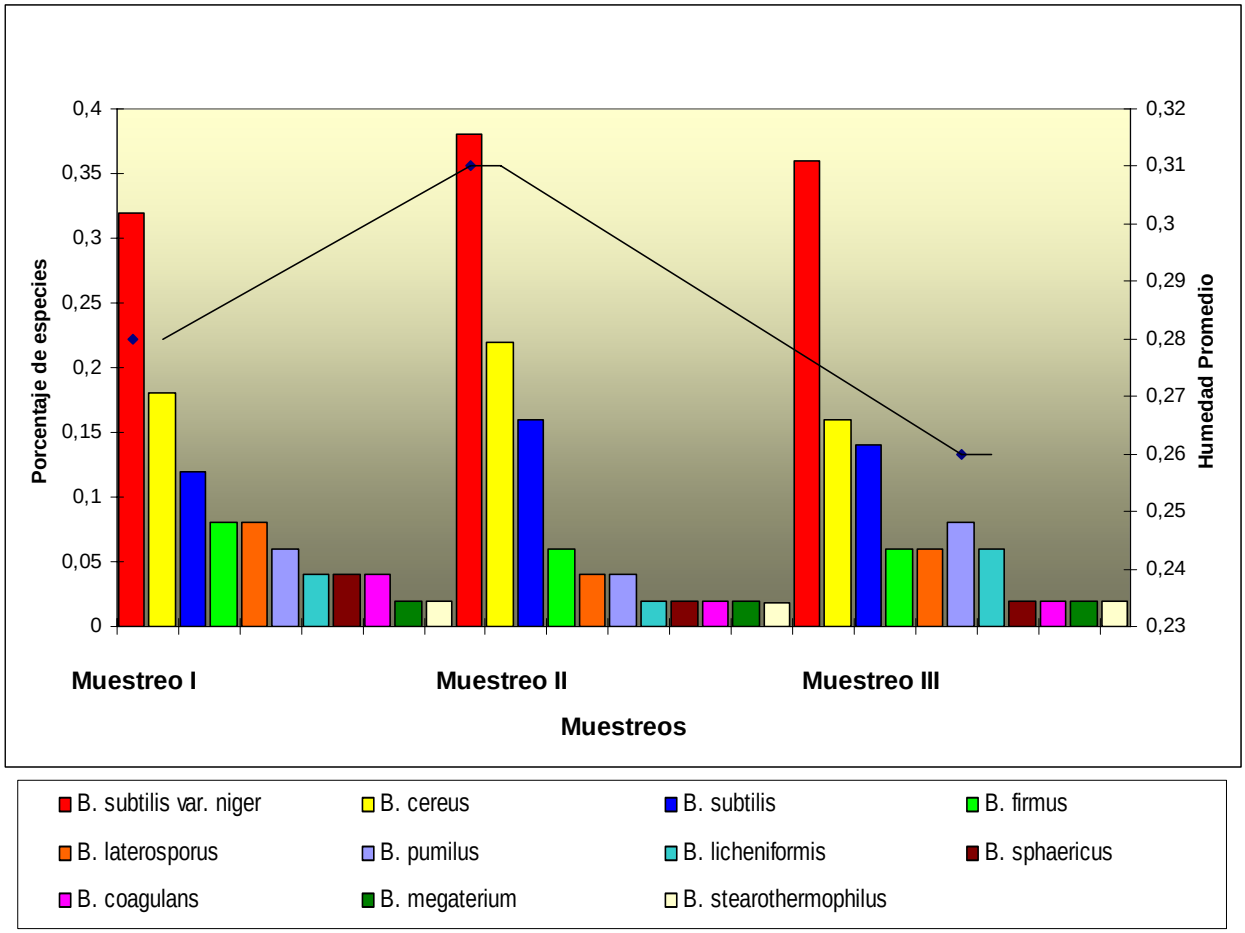

Figura 14: Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de bosque de *P. radiata* de acuerdo a la humedad.

En la Figura 14 se muestra la variación de la humedad del suelo del lugar de muestreo registrada durante las épocas de recolección versus las poblaciones del género *Bacillus.* Estos resultados se expresan por la pérdida de gramos a partir de 1 gramo de muestra. Como se observa la mayor humedad alcanzada se registró en invierno (0.31grs.) la cual tiene directa relación con una distribución de las bacterias que presentan mayor porcentaje y una disminución en las bacterias que son menos frecuentes o que presentan un menor porcentaje. La menor humedad se observó en el muestreo de primavera (0.26 grs.) donde se registra una directa relación con una disminución de las bacterias que presentan mayor porcentaje y un leve aumento en aquellas que tienen un menor porcentaje de predominancia.

4.5 Poblaciones bacterianas del género *Bacillus* aisladas de suelo de pradera permanente de acuerdo a su relación con parámetros físicos.

En las Figuras 15 y 16 se muestra las variaciones de las poblaciones bacterianas del género *Bacillus* (150) aisladas de suelos de pradera permanente, para cada época de muestreo, de acuerdo a la temperatura (Fig. 15) y humedad (16).

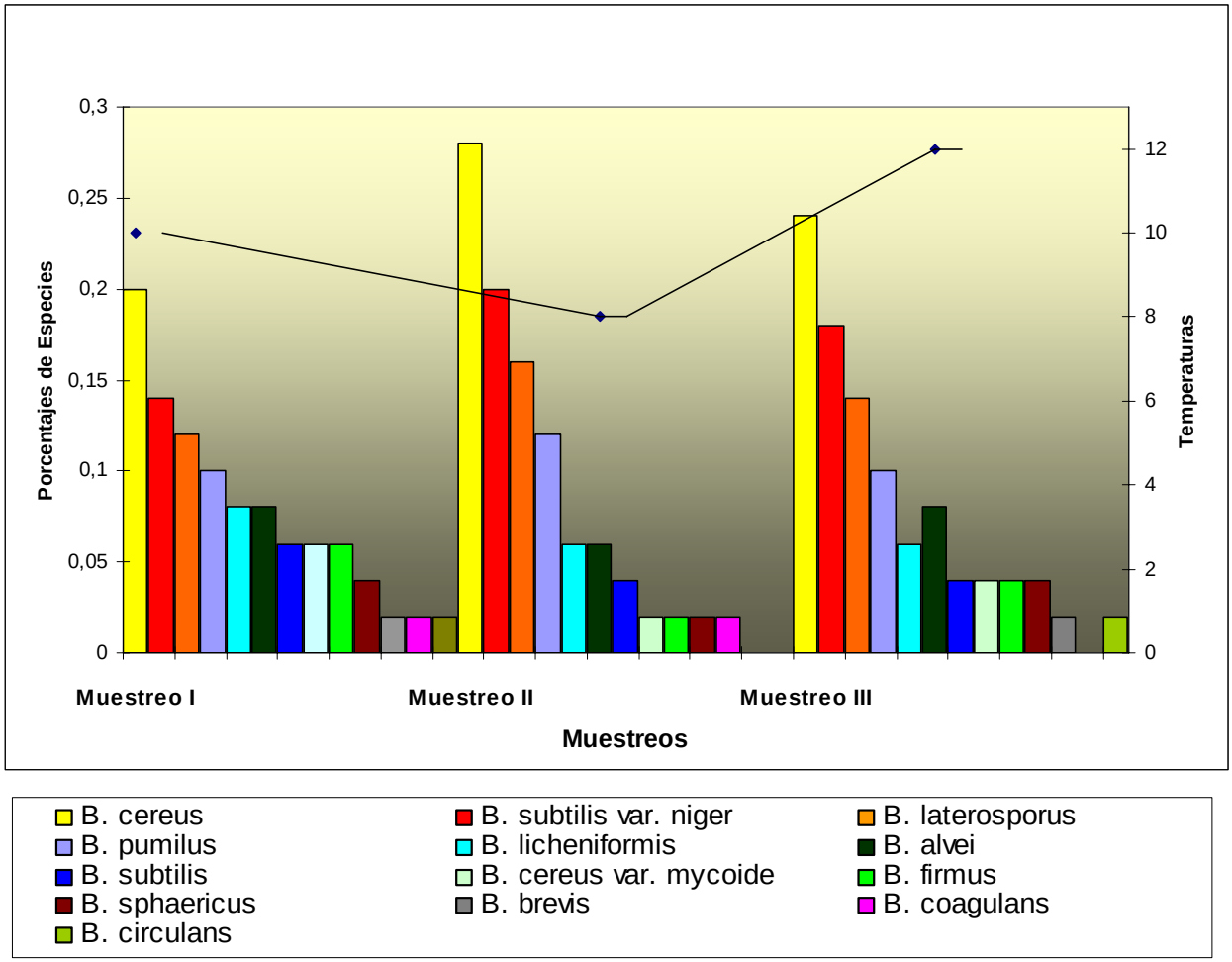

Figura 15: Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de pradera permanente de acuerdo a la temperatura.

En la Figura 15 se muestra la variación de temperatura del suelo del lugar de muestreo registrada durante las épocas de recolección versus las poblaciones de especies del género *Bacillus*. Como se observa la mayor temperatura (12ºC) se registró en primavera la cual tiene directa relación con una disminución de las especies mas frecuentes y un leve aumento en las que presentan una menor frecuencia. La menor temperatura (8ºC) se registró en invierno donde se relaciona un aumento en las especies que tienen mayor frecuencia y una disminución en las que no.

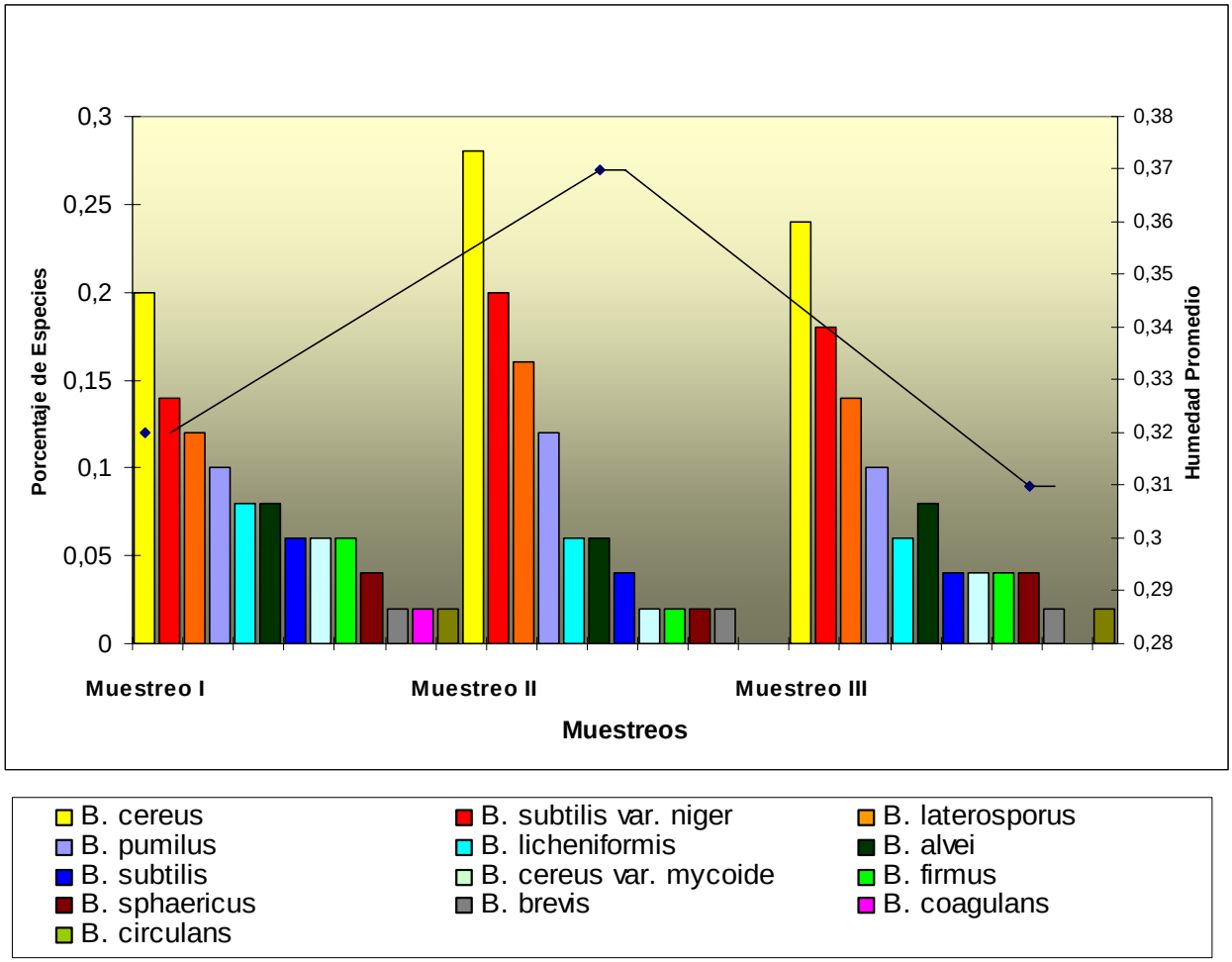

Figura 16: Relación de las especies del genero *Bacillus* aisladas de un suelo de pradera permanente de acuerdo a la humedad.

En la Figura 16 se muestra la variación de la humedad del suelo del lugar de muestreo registrada durante las épocas de recolección versus las poblaciones de especies del género *Bacillus.* Estos resultados se expresan por la pérdida de gramos a partir de 1 gramo de muestra. Como se observa la mayor humedad alcanzada se registro en invierno (0.37grs.) la cual tiene directa relación con una distribución de las bacterias que presentan mayor frecuencia y una disminución en las bacterias que son menos frecuentes o que presentan un menor porcentaje. La menor humedad se observa en el muestreo de primavera (0.31 grs.) donde se registra una directa relación con una disminución de las bacterias que presentan mayor frecuencia y un leve aumento en aquellas que tienen una menor.

5. DISCUSIÓN

5.1 Taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas de suelos de bosque de *Pinus radiata* y pradera permanente.

Las especies aisladas del presente estudio demuestra que estas bacterias son fácilmente recolectadas en muestras de suelo, obteniendo un gran número de ellas (300), tal como lo indica Castillo *et. al.* (2004) las bacterias pertenecientes a este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son fácilmente aisladas desde suelo y restos de materia orgánica, especialmente en la rizosfera donde se encuentra un gran número de vitaminas, aminoácidos y carbohidratos (Starr, 1981).

Tal como lo describe Holt *et. al.* (2000) se clasificaron las bacterias por su forma bacilar, Gram positivas, catalasa positiva y otras pruebas descritas anteriormente, obteniendo parámetros cualitativos para posteriormente desarrollar la taxonomía de éstas.

Estudios indican que las bacterias de este género se encuentran naturalmente en el suelo formando la microflora propia de estos. Tal como lo indica un estudio de Sackenheim (1996) en el cual se diluyeron muestras de suelo en la localidad de Azapa en el norte de Chile en dos épocas distintas, en este estudio se pudo descifrar que la gran variedad de especie del género *Bacillus* es amplia en estos suelos, lo cual coincide con este estudio en que las especies de este género están ampliamente distribuidas y que son fácilmente aislables mediante los mismo métodos utilizados en ambos estudios.

Otros estudios también coinciden con los resultados obtenidos con respecto a este género como lo indica Villarroel (2001), el cual realizó un estudio en suelos Hapludand, sector Pelchuquín de la ciudad de Valdivia, tanto en pradera permanente como en pradera en rotación y bosque nativo, encontrando una gran diversidad de especies del género *Bacillus*.

En los estudios antes mencionados solo se trabajó y aisló cepas de este género sin una taxonomía profunda, se aislaron cepas de *Bacillus, Arthrobacter, Cellulomonas, Corynebacterium, Enterobacteriaceae, Pseudomas* y *Streptomyces.*

En trabajos realizados por Nazia-Khurshed (2005) en muestras de suelos de Paquistan, se identificaron siete especies del género *Bacillus* tales como *B. sphaericus, B. brevis, B. firmus, B. coagulans, B. stearothermophilus* y *B. megaterium*, los cuales coinciden con los resultados obtenidos en este estudio, en el cual se identificaron las mismas especies, *B. sphaericus, B. firmus y B. coagulans*, se aislaron de ambos suelos muestreados, por el contrario *B. stearothermophilus* y *B. megaterium* sólo se aisló en muestras de suelo de bosque de *P. radiata* y *B. brevis* sólo en suelos de pradera permanente. También estudios realizados por Ogunshe (2006) en suelos de Nigeria, donde se siembran las semillas de *Albizia saman*, se encontraron varias especies de *Bacillus* como: *B. cereus var. mycoide, B. coagulans, B. licheniformis, B. megaterium, B. pumilus* y *B. subtilis*, los cuales se comparan con las mismas especies obtenidas en el presente estudio. En ambos suelos muestreados coinciden las bacterias *B. coagulans, B. licheniformis, B. pumilus* y *B. subtilis*, por otro lado *B. cereus var. mycoide* sólo se aisló en suelos de pradera permanente y *B. megaterium* sólo en suelos de bosque de *P. radiata*.

Dentro de las cepas con mayor frecuencia en el presente estudio está en primer lugar *B. subtilis*, el cual también se a encontrado en gran cantidad en otros suelos, tal como lo describe Romero-Tabarez (2006), donde esta cepa bacteriana fue estudiada y aislada de suelos, e investigada por su producción de antibióticos bacteriostáticos (7-O- Malonyl macrolactina A) que inhibe un número de patógenos bacterianos Gram positivos, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Enterococci.* Otro trabajo similar fue descrito por Budde (2006), el cual aisló cepas de esta especie y observó su capacidad para resistir condiciones de baja temperatura observando la expresión génica de este, la tasa de crecimiento, la motilidad y la quimiotaxis. También Lester (2007) aisló esta especie en muestras superficiales de suelo en la región del desierto de Atacama, Chile, realizando la taxonomía mediante carbón orgánico total, ácidos grasos de los fosfolípidos y las características culturales.

Dentro de otras especies que fueron altamente aisladas se encuentra *B. cereus*. En una publicación realizada por Vilain (2006), se aisló esta especie y se observó su ciclo vital en el suelo donde participa activamente en los ciclos biogeoquímicos, con capacidad de germinar, crecer y esporular y volver a crecer. Otro estudio en el cual se encuentra *B. cereus* es el realizado por Bizani (2005), donde formula que esta especie bacteriana fue aislada del suelo directamente y fue investigada por la acción de una enzima llamada Cereina-8A la cual tiene una función bactericida contra Listeria, inhibiendo además el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella.*

Otra cepa aislada en este estudio es *B. firmus* la cual también fue aislada desde suelos donde se siembra el maní (*Arachis hypogaea)*, al sur de Tailandia, por Pengnoo (2006), utilizando los mismos métodos de dilución y calentamiento de muestras. Esta bacteria tiene la

capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solana*, agente causal de la destrucción de la hoja del maní (*Arachis hypogaea)*. En otros estudios también se pudo aislar esta especie en suelos donde se siembra *Triticum sativum* (trigo) por Barneix (2005) en dos sitios de muestreos, Buenos Aires y Castelar, Argentina, donde esta especie bacteriana ayudaba al crecimiento del trigo y a obtener una mejor calidad del grano.

En cuanto a la cepa *B. laterosporus* y *B. pumilus*, existen estudios realizados por Lurlina (2005), el cual indica que estas cepas bacterianas han sido aisladas en miel y cuerpos de abejas produciendo enfermedades en estas, también describe que es posible encontrarlas en el suelo pero, en muy pequeña cantidad. Este mismo autor presenta otro trabajo realizado el año 2006, donde recoge muestras en un supermercado de distintos productos tales como miel, harina y queso, donde estas bacterias estaban presentes en todos los productos mencionados, por lo cual estas bacterias están asociadas a los alimentos y a la descomposición de ellos.

Por otro lado *B. pumilus* también a sido aislado de la rizósfera, según estudios de Hafeez (2006), esta cepa bacteriana ayudaría a aumentar la cosechas del trigo en Orkhon, Mongolia.

B. coagulans, fue aislada en la rizósfera de la planta del coco teniendo efectos alelopáticos positivos para ayudar al crecimiento de esta planta (Murali-Gopal, 2006)

Otra especie descrita es *B. circulans*, la cual en estudios realizados por El-Haddad (1996) determina su capacidad para colonizar plantas de interés económico (*Trifolium spp* (trébol), *Triticum sativum* (trigo), *Vicia faba* (haba), *Lens esculenta* (lenteja), *Solanum lycopersicum*

(tomate), *Curcubita maxima* (calabaza), *Zea mays* (maíz) y *Solanum tuberosum* (tubérculo de papa) en el Cairo, Egipto; los resultados indican que esta bacteria mejoraría la calidad de estas plantas, ayudando a movilizar el silicato y el potasio. Otro estudio similar lo realizó Tilak (2006) en la India, donde se observó y aisló esta bacteria junto con *B. cereus* de la rizósfera del maíz, ayudando a que esta planta sea de mejor calidad.

Por último tenemos a *B. alvei*, la cual en un trabajo realizado por Shakoori (2003) en Islamabad, extrajo esta especie junto con *B. coagulans, B. brevis, B. subtilis* y *B. circulans* de muestras de miel de abejas, las cuales pueden producir enfermedades en estas, pero no así en la salud de humanos.

De las 150 cepas bacterianas aisladas desde muestras de suelo de bosque de *P. radiata*, se clasificaron 11 especies, siendo las especies *B. subtilis var. niger, B. cereus* y *B. subtilis* las que se aislaron en mayor porcentaje, bacterias pertenecientes a estas mismas especies fueron descritas por Holt *et. al*. (1984) en el manual de Bergey`s.

De las especies determinadas en el presente estudio *B. subtilis var. niger, B. firmus, B. subtilis, B. cereus, B. laterosporus, B. pumilus, B. licheniformis, B. sphaericus, B. coagulans, B. megaterium* y *B. stearothermophilus* coinciden con lo que establece Bastidas (1981), quien determinó a partir de muestras de suelo de bosque de *P. radiata* ubicado a 7 kilómetros de la salida norte de la ciudad de Valdivia, X Región de Chile, que la mayoría de las bacterias presentes en estos suelos son los descritos anteriormente. En los resultados obtenidos por este autor y los del presente estudio, podemos inferir que durante más de 20 años no se han detectados

cambios en la flora bacteriana de los suelos en cuanto a estas especies bacterianas, ya que en ambos estudios se encontraron las mismas especies de *Bacillus* pero con distintos porcentajes. Debemos destacar que el estudio de Bastidas (1981), solo se realizó en una época de muestreo y no en las distintas estaciones del año como en el presente trabajo.

Dentro de la bibliografía los resultados obtenidos en el presente estudio coincide en que *B. subtilis var. niger, B. cereus* y *B. subtilis* pueden ser fácilmente aisladas de muestras de suelo, debido a que se presentan en alta frecuencia en los sectores en que se realizó el estudio, según lo descrito por Starr en 1981, que habla con respeto a que estas bacterias están presentes en la rizósfera del suelo y donde se encuentran grandes cantidades de aminoácidos, carbohidratos y vitaminas.

De las 150 cepas bacterianas aisladas desde muestras de suelo de una pradera permanente, se clasificaron 13 especies, siendo las especies *B. cereus, B. subtilis var. niger,* y *B. laterosporus* las que se aislaron con mayor frecuencia, bacterias pertenecientes a estas mismas especies fueron descritas por Holt *et. al*. (1984) en el manual de Bergey`s.

De las especies determinadas en el presente estudio, *B. cereus, B. laterosporus, B. subtilis var. niger, B. pumilus, B. licheniformis, B. alvei, B. subtilis, B. cereus var. mycoide, B. firmus, B sphaericus, B. brevis, B. circulans* y *B. coagulans* coinciden con lo que establece Bastidas (1981), en un estudio anteriormente descrito, determinó que la mayoría de las bacterias presentes en estos suelos son los descritos anteriormente.

Dentro de la literatura citada, Bastidas (1981), es el único autor el cual ha realizado un estudio semejante al efectuado en el presente trabajado, debido a que éste se basó en el trabajo antes realizado utilizando las mismas técnicas y métodos para poder realizar la taxónomia de las bacterias aisladas de los suelos descritos con anterioridad. Es por ello y como lo describe Bastidas (1981), estas bacterias estarían presentes a lo largo de toda la provincia de Valdivia, y serian estas (bacterias formadoras de esporas) las que dominan en estos suelos.

Dentro de ambos estudios las especies bacterianas son similares en cuanto a su frecuencia y distribución, podemos comparar la pradera permanente del presente estudio con el bosque nativo del estudio del autor citado, ya que las bacterias presentes allí se comparan con las obtenidas en este estudio. Por último podemos mencionar que las bacterias presentes en los bosques de *P. radiata* en ambos estudios se comparan en cuanto a frecuencia y especies.

De la comparación de las cepas bacterianas relacionándolas con parámetros físicos, según los autores, estas bacterias no se verían afectadas según estos parámetros, debido a que, si no se encuentran cómodas en un lugar, forman endosporas (Foster, 2001. Starr 1981), pudiendo colonizar de la misma forma el suelo en el que se encuentran y así poder sobrevivir y encontrarse en cualquier tipo de sustrato. Por ende, no les afecta ni la temperatura ni la humedad, ya que si las condiciones de estos parámetros fluctúan, ellas forman estructuras de resistencia acomodándose a las condiciones del medio (Schlegel, 1997).

5.1 Conclusiones.

1. La mayor diversidad de taxas se presentaron en muestras de pradera permanente, obteniéndose un total de 13 probables especies del género *Bacillus*, siendo la menor diversidad en la época de invierno y la mayor en otoño.

2. Dentro de los sectores de muestreo existió diferencia entre las posibles taxas recolectadas, debido a que en bosque de *P. radiata* se recolectaron 11 especies, por el contrario en suelo de pradera permanente se obtuvieron 13 especies, de las cuales solo 9 coincidieron en ambos suelos muestreados, las restantes corresponden a especies pertenecientes a cada sector de muestreo y que no se repiten en ambos suelos.

3. En relación de los parámetros físicos versus las poblaciones bacterianas del género *Bacillus*, independiente del lugar de muestreo, las menores poblaciones se presentaron en la época de invierno, donde se encontraron los menores valores de temperatura (5º C) y una alta humedad (0.37 grs.), en comparación con las otras épocas de muestreo, tanto de otoño como primavera.

De acuerdo a los resultados obtenidos con respecto a la igualdad en cuanto a la diversidad de especies en ambos sectores muestreados, tanto en suelo de bosque de *P. radiata* y pradera permanente y lo postulado en las conclusiones, la hipótesis del presente estudio se rechaza.

6. LITERATURA CITADA

Alexander, M. (1980). Introducción a la Microbiología del suelo. Segunda edición, Libros y editoriales S.A. 1980 México, D.F. 491p.

Barneix, A J. (2005). Effect of rhizobacteria on growth and grain protein in wheat. Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. Agronomy for Sustainable Development. 25(4): 505-511. (Summary)

Barriga G., Giono S. y Osorio L. (2001). Articulo: Ántrax. Revista Mexicana de Patología Clínica. Microbiología, epidemiología, manifestaciones clínicas, diagnostico, prevención y tratamiento. Vol. 48. Num. 4.

Bastias P. (1981). Especies del Género *Bacillus cohn* (1872) (Buchanan et al. 1974) en dos habitats de la zona de Valdivia. Tesis de título para profesor de Biología y Química. Universidad Austral de Chile. Valdivia–Chile. 30 p.

Bizani, D. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a becteriocin-like peptide produced by Bacillus cereus. Department of Food Science, Porto Alegre, Brazil. International Microbiology. 8(2): 125-131.

Budde, I. (2006). Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. Laboratory for Microbiology, department of Biology, Philipps-University Marburg. Germany. Microbiology-Reading. 152(3): 8031-853. (Summary)

Castillo, C., Sosa, B y Scorza, J. (2004). Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género *Bacillus*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 24, num 1-2, p 65-67.

Corporación Nacional Forestal. Online. www.conaf.cl, Plantaciones 2001. Ingreso a la página el 18 de mayo de 2005.

Cowan, T. Holt, J. Liston, J. Murray, R. & Stanier, R. (1974). Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Edition. Edited by the Williams & Wilkins company. United State of America. 1268 p.

El-Haddad, M. (1996). Evaluation of the effectiveness of some local isolates of silicate bacteria. Unit of Biofertilizers, Microbiol. Dept., Fac. of Agric., Ain shams Univer., Cairo, Egypt. Source: Annals of Agricultural Scienc, Moshtohor. 36(4): 2191-2207. (Summary)

Foster, A. (2001). Magazine: Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK. 91(2):364-72.

Girard, H y Rougieux, R. (1964). Técnicas de microbiología agrícola. Edición Española, Editorial Acribia, Zaragoza, España. 267p.

Hafeez. F. (2006). Plant growth promoting bacteria as biofertilizer. National institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), Jhang Road, Faisalabad, Pakistan. Agronomy for Sustainable Development. 26(2): 143-150. (Summary)

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. (2000). Bergey´s, Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 787 p.

Holt, J., Sneath, P., Mair, N. & Sharpe, M. (1984). Bergey´s, Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA. 965-1599 p.

Iañez, E. (2003). Curso de Microbiología General. Quimioterápicos de síntesis y Antibióticos. Buenos Aires-Argentina.

Instituto Forestal. Online. www.infor.cl., Distribución geográfica del recurso forestal 2003. Ingreso a la página el 18 de mayo de 2005.

Lester, ED. (2007). Microflora of extreme arid Atacama desert soils. Jet Propulsion Laboratory, Pasadena, USA. Source: Soil Biology and Biochemestry. 39(2): 704-708.

Lisboa, HB. (1993). The Chilean radiata pine sector. En: Lewis NB and Ferguson IS (eds) Management of radiate pine, pp 365–379. Inkata Press, Australia.

Lurlina, M. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. Departamento de Química, Bromatología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina. Internacional Journal of Food Microbiology. 105(3): 297-304. (Summary).

Lurlina, M. (2006). Prevalence of Bacillus spp. in different food products collected in Argentina. Departamento de Química, Bromatología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 39(2): 105-110.

Maragaño, M. (2003). Efectos de las plantaciones de *Pinus radiata* D. Don sobre el recurso agua en la localidad de Gualleco, zona de secano costero, VII Región. Tesis para título de Ingeniero Forestal. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 40 p.

Murali-Gopal. (2006). Allelopathic effects of root and leaf leachates of coconut on selected beneficial microorganisms from coconut rhizosphere. Source: Microbiology Section, Central Plantation Crops Research Institute, kudlu P.O. Kerala, India. Allelophathy Journal. 18(2): 363-368. (Summary).

Nazia-Khurshed, S. (2005). Characterization of locally isolated strains of *Bacillus* and their evaluation as potential biocides against house fly, *Musca domestica*. School of Biological Sciences, University of the Punjab, Lahore, Pakistan. Pakistan Journal of Zoology. 37(4): 249-255. (Summary)

Ogunshe, A. (2006). Microbial studies on AISA. A potencial indigenous laboratory fermented food condiment from *Albizia saman* (Jacq.) F. Mull. Applied Microbiology and Infectious Diseases Unit, Department of Botany and Microbiology, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria. Pakistán Journal of Nutrition. 5(1): 51-58.

Olivares, B., Meneses, M. & Paredes G. (1992*). Pinus radiata* investigación en Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 385 p.

Oviedo, P. (1996). Revista de extensión, Tecno Vet. Intoxicación Alimentaría. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Año 2 num. 1. Marzo 1996.

Pengnoo, A. (2006). Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf blight disease of bambara groundnut (Vigna subterranea). Department of Earth Science, Faculty of natural. Source world Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(1): 9-14 (Summary).

Repetto, F. (2005). Variaciones en la comunidad microbiana total de fragmentos, debido a cambios abióticos diferenciales según la matriz que los rodea. Lic. Ciencias Ambientales con Mención en Biología, Curso de Ecología de Ambientes Fragmentados. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Romero-Tabarez, M. (2006). 7-O_malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin- resitant enterococci, and a small-colony variant of Burkholderia cepacia. Division of Microbiology, German Research Centre for Biotechnology. Braunschweig, Germany. Antimicrobial agents and chemotherapy. 50(5): 1701-1709.

Sánchez-Yánez, J. (2004). Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis.* Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán-México.

Sackenheim, R. (1996). Efectos de la solarización y de la fumigación sobre la población natural de *Bacillus spp., Pseudomonas spp., Fusarium spp*. y *Fusarium oxysporum* en el Valle de Azapa, primera región de Chile. Investigación agrícola. v. 16(1-2) p. 57-66. (Summary).

Schlegel, H. (1997). Microbiología general, Ediciones Omegas, S.A., Barcelona. 654 p.

Shakoori, F. (2003). Microbiological analysis of Money of *Apis mellifera*. Department of Zoology, Government College University, Lahore, Pakistan. Source: Proceedings of Pakistan Congress of Zoology. 23: 237-242. (Summary).

Starr, M. (1981). The Prokaryotes, vol. 2. Edited by Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. 1106-2284 p.

Tate, R. (2000). Soil Microbiology, segunda edición. Edited by John Wiley & Sons, Canadá. 508p.

Tilak, K (2006). *Bacillus careus* and *B. circulans* – novel inoculants for crops. Department of Botany, Osmania University, Hyderabad, India. Source: Current Science. 90(5): 642-644. (Summary).

Valenzuela, E. (2003). Guía Pasos Prácticos Microbiología 112, edita Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, 40 p.

Vilain, S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte Bacillus cereus in liquid soil extract and in soil. Department of Biology and Microbiology, South Dakota, Brookings, USA. Applied and Environmental Microbiology. 72(7): 4970-4977.

Villarroel, C. (2001). Caracterización bacteriana de un suelo Hapludand sometido a tres manejos distintos en dos épocas de muestreo. Universidad Austral de Chile. Fac. de Ciencias Agrarias, Valdivia 2001, Tesis Ingeniero Agrónomo. 113 p.

ANEXOS

ANEXO 1

Recetas reactivos y medios de cultivos.

a) Agar Nitrato semi sólido

2 g. de Peptona

0,2 g. Na_2HPO_4 + 12 H_2O

0,1 g. Glucosa

0,4 g. Agar Agar

0,1 g. KNO_3

200 mL agua destilada estéril

Al agua destilada agregar el agar agar, dejar remojar tres a cuatro horas, agregar fosfato, glucosa (pH: 7,2) esterilizar en autoclave a 105ºC por 15 minutos y dispensar en tubos.

b) Agar peptona.

0,6 g. extracto de carne.

1 g. NaCl.

2 g. Peptona.

4 g. Agar Agar.

200 mL de agua destilada estéril.

Esterilizar en Autoclave a 1 atmósfera (121ºC) por 15 minutos.

c) Almidón.

50 mL solución salida estándar.

10 mL extracto de tierra.

1,5 g Almidón.

1 mL solución de oligoelementos

1000 mL agua destilada estéril.

Esterilizar a media atmósfera por 20 minutos y dispensar en tubos.

d) Caldo peptona.

3 g. Extracto de Carne

5 g. Cloruro de sodio (NaCl)

10 g. Peptona

1000 mL Agua destilada

Se mezclan los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121ºC) por 15 minutos.

e) Hidratos de Carbono.

10 g. peptona.

1 g. extracto de carne.

5 g. NaCl.

1000 mL agua destilada estéril.

10 g. hidrato de carbono.

A la solución agregar azul de Bromotimol y esterilizar a 1 atmósfera por 15 minutos y dispensar en tubos con casquete.

f) Lugol.

1 g. de yodo.

2 g. yoduro de potasio.

300 mL agua destilada estéril.

Agregar el yoduro de potasio al agua destilada y una vez disuelto poner el yodo en un mortero y moler, agregar de a poco a la solución.

g) Reactivo de Barrit.

Solución A:

Naftol 5% + Alcohol etílico

Solución B:

KOH al 40%

Se mezclan independientemente los ingredientes de cada solución y luego se agitan, conservar en la oscuridad y a temperatura ambiente.

h) Reactivo Nitrato.

Solución A:

0.8 g. Ácido sulfanílico

100 mL. ácido acético 5N

Solución B:

0.5 g. Alfa naftilamina

100 mL. ácido acético 5N

Se mezclan en forma independiente cada solución luego se agitan, conservar en la oscuridad y a temperatura ambiente.

ANEXO 2

Tablas.

Tabla 1. Resumen de especies obtenidas en cada muestreo, tanto en suelo de *P. radiata* y suelos de pradera permanente.

Muestreos de suelo de bosque de *P. radiata*

Especie	Otoño	Invierno	Primavera
B. subtilis var. niger	16	19	18
B. cereus	9	11	8
B. subtilis	6	8	7
B. firmus	4	3	3
B. laterosporus	4	2	3
B. pumilus	3	2	4
B. licheniformis	2	1	3
B. sphaericus	2	1	1
B. coagulans	2	1	1
B. megaterium	1	1	1
B. stearothermophilus	1	1	1

Muestreos de suelo de pradera permanente.

Especie	**Otoño**	**Invierno**	**Primavera**
B. cereus	10	14	12
B. subtilis var. niger	7	10	9
B. laterosporus	6	8	7
B. pumilus	5	6	5
B. licheniformis	4	3	3
B. alvei	4	3	4
B. subtilis	3	2	2
B. cereus var. mycoide	3	1	2
B. firmus	3	1	2
B. sphaericus	2	1	2
B. brevis	1	1	1
B. coagulans	1	0	0
B. circulans	1	0	1

Tabla 2. Resumen de la humedad en los distintos sectores muestreados y en las distintas épocas de recolección.

OTOÑO	
SECTOR	Promedio de humedad
suelo de bosque de *P. radiata*	0,28
suelo de pradera permanente	0,32

INVIERNO	
SECTOR	Promedio de humedad
suelo de bosque de *P. radiata*	0,31
suelo de pradera permanente	0,37

PRIMAVERA	
SECTOR	Promedio de humedad
suelo de bosque de *P. radiata*	0,26
suelo de pradera permanente	0,31

Tabla 3. Resumen de la temperatura en los distintos sectores muestreados y en las distintas épocas de recolección.

MUESTREO	***P. radiata***	**Pradera**
OTOÑO	7ºC	10ºC
INVIERNO	5ºC	8ºC
PRIMAVERA	8ºC	12ºC

Tabla 4. Clave para la taxonomía bacteriana.

Cepa bacteriana	Catalasa	V.P.	Nitrato	Citrato	Gas Pack	Almidón	Glucosa	Manitol	Xylosa	Arabinosa	Endospora
B. subtilis var. niger	+	V	-	-	+	V	+	V	V	V	1
B. cereus	+	V	+	-	+	V	+	-	-	-	1
B. laterosporus	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	6
B. subtilis	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	1
B. licheniformis	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	1
B. pumilus	+	-	-	-	-	-	+	+	V	-	1
B. firmus	+	V	+	-	-	+	+	+	+	-	1 ó 3
B. alvei	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	3 ó 4
B. stearothermophilus	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	3
B. coagulans	+	+	V	-	+	-	+	+	-	-	4
B. sphaericus	+	V	-	-	-	+	-	-	-	-	5
B. megaterium	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	1
B. circulans	+	+	V	-	+	V	+	-	-	-	3
B. brevis	+	-	V	+	-	-	V	V	-	-	4
B. cereus var. mycoide	+	V	+	-	+	+	+	-	-	-	1

+: Prueba positiva; -: Prueba negativa; V: variable; **1:** espora central; **3:** espora Terminal, célula madre hinchada; **4:** espora central, célula madre hinchada; **5:** espora Terminal redonda, célula madre hinchada; **6:** espora lateral, célula madre hinchada fusiforme.

ANEXO 3

Fotografías sector de muestreo.

Foto 1: Salida sur de Valdivia donde se realizó la recolección de suelos para el presente estudio.

Foto 2: Entrada al sector de muestreo.

Foto 3: Sector de muestreo visto desde la carretera.

Foto 4: Bosque de *Pinus radiata.*

Foto 5: Sector de muestreo bosque de *Pinus radiata.*

Foto 6: Pradera permanente.

Foto 7: Sector de muestreo pradera permanente.

Foto 8: Intersección entre ambos sectores de muestreo.

Foto 9: Intersección entre ambos sectores muestreados.