



**EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO ENTRE DISTINTAS CEPAS DE  
RIZOBACTERIAS AISLADAS DE SUELO EN PROCESO DE RESTAURACIÓN  
ECOLÓGICA EN LA LOCALIDAD DE USME**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C.  
2019**



**Evaluación del antagonismo entre distintas cepas de rizobacterias aisladas de suelo en proceso de restauración ecológica en la localidad de Usme**

**Stefany Calderón Alonso  
Verónica López Romero  
Yinneth Paola Peña Fonseca**

**Orientadora interna  
Carolina Jaime Rodriguez  
Microbióloga  
Especialista en Gestión Ambiental  
Magister en Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental**

**Orientador externo  
Camilo de los Ángeles Cárdenas  
Biólogo  
Doctor en Biología**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de La Salud  
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Trabajo De Grado**

**Bogotá D.C.**

**2019**

## **DEDICATORIA**

Mi trabajo de grado la dedico con todo amor y cariño a Dios que guía mis pasos y le da fortaleza a mi vida, a Gloria Alonso, a quién le debo y agradezco mis estudios Universitarios, a Luz Stella Alonso, que confía permanentemente en mi y me ha ayudado en todo lo que puede y más allá, para que sea una mujer ejemplar y llena de valores, a Johan Martínez, a él por estar incondicionalmente a mi lado, apoyándome en todos los momentos difíciles y también los más gratificantes, no solo de mi proceso de formación como profesional, si no también como persona.

**Stefany Calderón Alonso**

Dedico este trabajo de grado principalmente a Dios por ayudarme en cada paso de mi vida, darme la fuerza de voluntad y la paciencia para continuar y poder haber llegado a este punto, a mis padres Pedro López y Gilma Romero por haberme apoyado en mi carrera universitaria desde el principio, por el amor que me brindan, su confianza, por cada palabra de ánimo en los momentos más complicados y por estar ahí siempre que los necesito, a mi hermana Ayda López por su comprensión, por hacerme sonreír en los días difíciles y por su apoyo incondicional durante mi vida.

**Verónica López Romero**

A Ingrid Fonseca, mi musa, y a Javier Peña, mi soporte incondicional.  
Esto no sería remotamente posible sin su apoyo.

**Yinneth Paola Peña Fonseca**

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer en primera instancia a Dios, por permitirnos llegar a este punto de nuestras vidas y darnos paciencia y sabiduría, a nuestros familiares por apoyarnos siempre en los momentos más difíciles, confiando siempre en nuestras aptitudes.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por formarnos como profesionales íntegras y competentes para desarrollarnos en un campo amplio en un mundo laboral. A la Universidad Antonio Nariño y Tecnoparque nodo Bogotá del Sena por haber confiado en nosotras y brindarnos su apoyo intelectual, estructural y financiero en el desarrollo de este proyecto, y finalmente a nuestros asesores Carolina Jaime y Camilo de los Ángeles Cárdenas por instruirnos y asesorarnos en el proceso y elaboración este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	9
<b>LISTA DE TABLAS</b>	10
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b>	11
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	12
<b>RESUMEN</b>	13
2.1 Restauración ecológica	21
2.2 Disturbios en los ecosistemas: Bosque Alto Andino a nivel de daños ecológicos	23
2.3 PGPR y aplicaciones (cultivos agrícolas, cultivos forestales, revegetalización y restauración de coberturas vegetales).	25
2.4 Rizobacterias fijadoras de nitrógeno (ciclo del nitrógeno, géneros, especies)	26
2.5 Rizobacterias solubilizadoras de fosforo (ciclo del fósforo, géneros, especies)	27
2.6 Rizobacterias con actividad amilolítica	30
2.7 Metabolitos primarios y secundarios producidos por Rizobacterias	30
2.8 Hormonas promotoras del crecimiento vegetal	31
2.9.1 Determinación de AIA	34
2.9.2 Determinación de amonio	35
2.11 Tipos de fermentación líquida para la producción de biomasa microbiana	37
2.12 Técnicas de conservación de microorganismos	38
<b>3. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	41
3.1 Universo, población, muestra	41
3.2 Hipótesis, variables, indicadores	41
3.2.1 Hipótesis	41
3.2.2 Tabla de Variables e indicadores	42

3.3 Técnicas y procedimientos	42
3.3.1 Aislamiento de las rizobacterias	42
3.3.4 Cuantificación de amonio	44
3.3.4 Oxidasa y catalasa	45
3.3.5 Conservación de cepas	46
3.3.6 Viabilidad y pureza	46
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
4.1 Aislamiento de rizobacterias	47
4.2 Cuantificación de AIA y Amonio	51
4.2.2 Concentración de amonio	54
4.3 Oxidasa y catalasa	56
4.4 Caracterización morfológica	56
4.5 Antagonismo	60
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>84</b>
Anexo N°1. Aislamiento de rizobacterias.	85

## LISTA DE FIGURAS

**Figura N°1.** Reacción colorimétrica de Salkowski.

**Figura N°2.** Método colorimétrico fenol-hipoclorito.

**Figura N°3.** Curva de calibración de ácido indol acético.

**Figura N°4.** Curva de calibración de amonio.

**Figura N°5.** Aislamientos de Rizobacterias en medios selectivos.

**Figura N°6.** Pruebas de antagonismo en medios de cultivo entre las cepas de rizobacterias.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla N°1.** Variables e indicadores del proyecto.

**Tabla N°2.** Rizobacterias aisladas del Parque Eco Tecnológico UAN con sus respectivos códigos.

**Tabla N°3.** Caracterización morfológica y pruebas de oxidasa y catalasa de las cepas aisladas.

**Tabla N°4.** Resultados pruebas de antagonismo.



## LISTA DE GRÁFICAS

**Gráfica N°1.** Porcentaje de cepas por medio de cultivo

**Gráfica N°2.** Tipo de cepa aislada según sus características

**Gráfica N°4.** Curva de calibración de Ácido Indol Acético

**Gráfica N°5.** Curva de calibración de amonio.

**Gráfica N°6.** Producción Ácido Indol Acético (AIA) en las rizobacterias aisladas.

**Gráfica N°7.** Cepas con mayor producción de Ácido Indol Acético (AIA).

**Gráfica N°8.** Producción Amonio.

**Gráfica N°9.** Cepas con mayor producción de Amonio.

**Gráfica N°10** Número de cepas aisladas por cada medio de cultivo

**Gráfica N°11** Porcentaje de cepas aisladas de acuerdo a la identificación microscópica

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo N°1.** Aislamiento de rizobacterias.

**Anexo N°2.** Curva de Calibración de Ácido Indol Acético.

**Anexo N°3.** Curva de Calibración del Amonio.

**Anexo N°4.** Prueba de antagonismo.

**Anexo N° 5 .**Tabla de mediciones por triplicado de la curva de calibración de AIA.

**Anexo N°6.**Tabla de mediciones por triplicado de la curva de calibración de amonio.

**Anexo N° 7.** Concentración de ácido indol acético en las rizobacterias aisladas.

**Anexo N° 8.** Concentración de ácido amonio en las rizobacterias aisladas.

**Anexo N° 9.** Gram de rizobacterias.



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**  
**Facultad de Ciencias de La Salud**

**Evaluación del antagonismo entre distintas cepas de rizobacterias aisladas de suelo en proceso de restauración ecológica en la localidad de Usme**

**RESUMEN**

Este proyecto tiene como objetivo evaluar el antagonismo entre distintas cepas de rizobacterias aisladas de un suelo en proceso de restauración ecológica en la localidad de Usme autóctonas del Bosque Alto Andino. Se logró aislar 38 cepas de rizobacterias PGPR por sus siglas en inglés (plant growth-promoting rhizobacteria). Para ello, se aislaron las rizobacterias a partir de una muestra de suelo, por medio de cultivos selectivos. Como criterios para la evaluación de metabolitos, se empleó un modelo descriptivo en donde se cuantificó la producción de amonio y ácido indol acético (AIA) de las cepas aisladas.

Finalmente se realizó pruebas de antagonismo en los medios selectivos con las condiciones de temperatura indicada para cada uno, usando controles positivos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter sp.*, verificando que la prueba fuera aceptada, donde se midió el halo de inhibición para determinar la competencia entre ellas. Se realizó 27 enfrentamientos entre las cepas, donde 12 cepas no presentaron halo, 8 cepas presentaron un halo menor a 2 mm, y 7 cepas un halo mayor a 2 mm. Para la evaluación de viabilidad y pureza de las cepas se empleó caldo BHI y tinción de Gram.

Se escogieron cepas de rizobacterias con la mejor producción de metabolitos tipo amilasas, AIA, fijación de amonio con y sin efecto antagónico entre ellas, haciéndolas buenas candidatas para la elaboración de un consorcio microbiano tipo poliinoculo para poder emplearse en procesos de tipo restauración ecológica, en donde habrá favorecimiento del crecimiento de especies nativas.

**Palabras clave:** Rizobacterias, antagonismo, restauración

**Estudiantes:** Stefany Calderón Alonso, Verónica López Romero y Yinneth Paola Peña Fonseca

**Docentes:** Carolina Jaime Rodriguez y Camilo de los Ángeles Cárdenas

**Institución:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

**Fecha:** Noviembre de 2019

## INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias son un grupo de microorganismos pertenecientes a la rizosfera, cumplen la función de promover el crecimiento de las plantas, principalmente de raíces y tallos, mientras incrementa su producción de biomasa. Las rizobacterias han demostrado ser capaces de mejorar las condiciones en la recuperación de especies forestales, como de incrementar el desarrollo de raíces y captación de nutrientes. El crecimiento de las plantas está dado por la producción de fitohormonas, ácido giberélico, citoquininas y ácido abscísico, además de la liberación de fosfatos y la captación de nitrógeno<sup>1</sup>.

Actualmente, el Bosque Alto Andino en Usme ha sufrido diferentes disturbios en sus suelos y vegetación, lo que resulta una dificultad para el desarrollo de especies nativas, lo cual afecta a su regeneración y a los habitantes del sector que se benefician de los servicios ambientales brindados por el bosque, por esta razón, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal o rizobacterias pueden intervenir en este entorno favoreciendo el establecimiento y crecimiento de las plantas, sin embargo, se deben realizar diferentes estudios a estos microorganismos para conocer su potencial y las interacciones entre ellas para el buen funcionamiento en el desarrollo de especies vegetales.

Para emplear rizobacterias como PGPR no debe existir antagonismo entre ellas, para que cumplan con su función biológica. El antagonismo se caracteriza por inhibir el crecimiento de otro microorganismo o incluso su muerte o por una relación negativa hacia la otra<sup>2</sup>, lo que no es adecuado en la interacción entre las rizobacterias para la producción masiva de metabolitos favorables al crecimiento vegetal.

Este proyecto pretende el aislamiento, selección y caracterización de rizobacterias mediante un modelo descriptivo en donde son extraídas del suelo de Usme perteneciente al Bosque Alto Andino con el fin de realizar ensayos preliminares de un

inóculo microbiano por medio de pruebas de antagonismo y de producción de metabolitos determinando la capacidad que tienen las cepas como ayuda al crecimiento vegetal.

## 1. ANTECEDENTES

Según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible<sup>3</sup>, la cuarta parte del territorio de Colombia se encuentra deteriorado por la presión minera, demográfica y de especies invasoras que han transformado, degradado suelos y en general han destruido los ecosistemas. Es por lo anterior que se propuso el Plan Nacional de Restauración Ecológica, Rehabilitación y Recuperación de Áreas Degradadas (PNR), el cual busca “orientar y promover procesos integrales de restauración ecológica para recuperar las condiciones de los ecosistemas como su estructura, su composición o sus funciones”<sup>3</sup>. Dicha restauración ecológica consiste en la reparación de un ecosistema, la cual debe procurar volver a las condiciones similares que se encontraba antes de su conversión o antes de que ocurriese el disturbio con el objetivo de conservar, reponer el recurso natural, y restituir sus servicios ecosistémicos<sup>3-5</sup>.

Ante la situación planteada, la biotecnología ambiental de la mano con la ingeniería y el conocimiento científico, han propuesto la modificación de materiales por mecanismo y acción de agentes biológicos para generar múltiples beneficios al entorno y a la sociedad<sup>6</sup>. Este trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica extensa donde se seleccionó 30 artículos de investigación pertenecientes a los últimos 15 años para la construcción de los antecedentes. Las bases de datos consultadas fueron: Science Direct, Google Académico y Pubmed Central. Adicionalmente los criterios de búsqueda utilizados fueron: Caracterización de rizobacterias, Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y restauración de suelos a partir de PGPR.

En el año 2004 García L. et al<sup>7</sup> emplearon las rizobacterias para el crecimiento de árboles como encina (*Quercus ilex* ssp. Ballota) y el pino (*Pinus pinea*), concluyendo que estos microorganismos interfieren con la rizósfera de la planta ayudando al desarrollo de la especie vegetal. Además de ayudar a este desarrollo, aumenta las posibilidades de que una especie en estado crítico pueda volver a restablecerse en su entorno nativo<sup>8</sup>.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento son capaces de producir una fitohormona llamada ácido indol acético (AIA), la cual ha sido medida por técnicas tales como la cromatografía líquida de alta eficacia, que experimentó Castillo G. et al<sup>9</sup> en el 2005, en donde determinaron el “AIA presente en caldos de fermentación obtenidos a partir de la bacteria *Rhizobium sp*”. El ensayo resultó ser bastante exacto y preciso, y a su vez lineal y sensible en los intervalos de concentración que se midieron, logrando recuperaciones mayores al 70%, lo que permite que pueda combinarse con otros principios activos de destino agrícola. Además del AIA también se puede atribuir otras características favorables como la producción de solubilización de fósforo y sideróforos<sup>10,11</sup>. Según los autores Laslo E. et al<sup>11</sup>, Dias k. et al<sup>12</sup> en el 2012 y Ángulo C.<sup>1</sup>, en el 2014, estas capacidades generan una mayor colonización de la rizósfera, debido a su mayor adherencia y capacidad competitiva.

En el año 2009, Costa C. et al<sup>13</sup>, reportaron que las especies de *B. megaterium*, *B. pumillis* y *B. cereus* fueron encontradas en la rizósfera del pasto braquiaria en donde cumplían la función de promotoras del crecimiento gracias a los metabolitos producidos, tales como el ácido giberélico.

Sánchez D. et al<sup>14</sup>, determinaron que *Pseudomonas* tiene la capacidad de producir indoles, sideróforos y solubiliza fósforo de fuentes muy poco solubles estimulando el crecimiento de las plantas. Los metabolitos producidos no solo apoyan el crecimiento vegetal sino al mejorar las condiciones del suelo a pesar de su estado deteriorado como se reporta en el estudio de Sun H. et al<sup>15</sup> en 2014, donde evaluaron la capacidad de las rizobacterias para mejorar la vegetación de las dunas de la arena costera, área afectada por la industrialización, donde las rizobacterias en combinación con resinas de intercambio iónico ejercieron un efecto útil en el progreso ambiental.

Así mismo, la deforestación es una problemática ambiental que degrada el suelo cambiando sus características físico químicas siendo muy difícil que restablezca los nutrientes y sus condiciones anteriores. Montiel R. et al<sup>16</sup>, evaluaron inóculos de rizobacterias que aportaran las propiedades suficientes a las semillas del programa de



reforestación para el desarrollo de las raíces y la germinación de las plantas encontradas en “área natural Sierra de los Agustinos, Tarimoro, Guanajuato”. También el crecimiento del híbrido de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus* en donde se determinó que el uso de las rizobacterias es una técnica biotecnológica efectiva para la industria forestal<sup>17</sup>.

Igualmente, las rizobacterias fueron estudiadas por Uniyal N. et al<sup>18</sup>, en este estudio se evidenció la solubilización de fosfato como un factor para el crecimiento vegetal y la mejoría de la rizosfera. Por otra parte, se han empleado bioinoculantes en donde han tenido diversos efectos. “Mientras que en algunas ocasiones los bioinoculantes han tenido un impacto significativo en el aumento de la producción vegetal, en otras ocasiones su impacto ha sido más bien discreto o nulo”<sup>19</sup>.

Con relación a la restauración del bosque alto andino en Colombia Montenegro A. et al<sup>20</sup> elaboraron una investigación, en la cual se estableció el árbol como organismo central para la recuperación del bosque por su acción amortiguadora a las condiciones ambientales y sus aportes al crecimiento de microorganismos favorecedores al suelo del área, dichos árboles son: *T. grossa*, *W. tomentosa*, *W. balbisiana*, *G. punctatum* y *P. pulchella*, dando como conclusión que los factores como condiciones ambientales y disturbios intervienen en cómo y de qué manera se debe hacer una restauración ambiental dependiendo del terreno a estudio y reparación ecológica. Uno de los inconvenientes en la restauración del bosque es la degradación del suelo por su pérdida de nutrientes lo que impide el aumento de especies vegetales, igualmente la “compactación, toxicidad, baja fertilidad y capacidad de retención de agua; disminución y desaparición de los organismos del suelo”<sup>21</sup> dificultan la rehabilitación del mismo. Así pues, el descenso de microorganismos en el suelo perjudica los procesos vitales en este como “fijación de nitrógeno, descomposición de materia orgánica, ciclado de nutrientes y aireación”<sup>21</sup> que a su vez perjudica el bienestar de las plantas.

Los parámetros que favorecen a las plantas que son sometidas a tratamientos con rizobacterias son: el fortalecimiento de las raíces, “área foliar, longitud de la raíz y peso

seco”<sup>22</sup>, además de tener un carácter antagónico contra los fitopatógenos <sup>23, 24</sup>. A pesar del interés creciente en éstas PGPR, surge como obstáculo su posible alteración por las condiciones ambientales a las que se enfrenta y por ende la inhibición de su acción. Para ésto, autores como Rheka et al<sup>25</sup> (2007), Yanhui He et al<sup>26</sup> (2016) y De Gregorio et al<sup>27</sup> (2017) han evaluado la posibilidad de inmovilizar estas PGPR para proteger a las células bacterianas al contacto con su entorno, mantener sus propiedades benéficas y permitir una mejor colonización de la raíz. Ellos han concluido que si bien se vio incrementado el crecimiento de las plantas por las rizobacterias, con la encapsulación éste proceso es más lento debido a su liberación lenta y controlada.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 Restauración ecológica

En los últimos años, el deterioro de los ecosistemas se ha incrementado debido a la mano del hombre para beneficio propio<sup>21</sup>, sin tener en cuenta las consecuencias. Los daños provocados han llevado a la degradación y/o destrucción del medio ambiente<sup>21</sup>, por tanto se necesita crear planes de contención, y es así como se establece el concepto de la restauración ecológica, el cual se atribuye a las técnicas requeridas para restituir las funciones y los componentes del ecosistema, en base a estudios y previo conocimiento de la zona a tratar con el objetivo de reestablecer el área a las condiciones precedentes al disturbio o a una aproximación. Al mismo tiempo se debe tener una idea clara sobre el entorno real para crear proyectos con diversas posibilidades y comprendiendo hacia dónde se dirige el trabajo<sup>21,28</sup>.

De acuerdo al plan nacional de restauración, sus objetivos son: 1. restauración ecológica, indica que después de la evolución del área tratada debe ser autosostenible asegurando las condiciones aptas para la supervivencia de las especies y de los servicios que ofrece. 2. Rehabilitación ecológica, el proceso para mejorar la zona de disturbio debe ser autosostenible, conservar algunas especies y suministrar algunos servicios ambientales, por último 3. Recuperación ecológica, se basa en redimir algunos servicios ecológicos, el área tratada no debe ser autosostenible ni parecerse a la zona previa al disturbio<sup>3</sup>.

Para iniciar un proceso de restauración se contemplan los factores sociales y naturales, entorno a un plan, el cual será diferente para cada caso dependiendo el disturbio generador, ya sea por sector agropecuario en laderas y ríos, daño del suelo por agricultura y/o pecuaria, deforestación por sistemas ganaderos y agrícolas, explotación de minerales, cultivos ilícitos, las infraestructuras vertimientos, incendios forestales

tormentas, sequías, erosión, huracanes, entre otros; cada uno tiene una estrategia diferente para llevar a cabo<sup>3</sup>.

Al mismo tiempo, se debe establecer parámetros específicos de estudio para caracterizar la zona, entre ellos cuál es la vegetación que se desarrolla, su distribución geográfica, su función; la disposición de la población, las comunidades incluyendo la variedad de especies, interacciones con otras especies, dimensión que ocupa, la producción primaria, el ecosistema y el paisaje en el que interviene la frecuencia e intensidad de los disturbios, la tendencia, la oscilación, Es importante tener las competencias científico técnicas para abordar la problemática y dar la mejor respuesta posible al problema planteado lograr los mejores resultados que se esperan<sup>28</sup>.

Además, es fundamental poner en práctica las estrategias de restauración más frecuentes, viables y económicas entre ellas: la rescisión de los disturbios, la selección de especies, la producción de micrositos y reparación de suelo. En efecto, la sucesión del restablecimiento del suelo inicia con la remoción de especies no nativas, la incorporación de fertilizantes para sustituir nutrientes faltantes, remover el suelo a sitios no afectados por los disturbios aprovechando las semillas para la creación de un banco, útil, el uso de endomicorrizas para el abastecimiento de energía o carbono<sup>29</sup>.

Para entender el proceso de restauración ecológica, es indispensable entender ciertos conceptos que abarcan este tema, como hábitat: sitio que cumple con las condiciones necesarias para que un organismo pueda vivir; ecosistema natural: lugar que se sustenta a sí mismo sin intervenciones externas, a diferencia de un ecosistema cultural donde el hombre participa; degradación: cambios que disminuyen el bienestar ecológico; daño, transformación notable en el ecosistema; transformación, cambio del ecosistema a otro; ecosistema de referencia, es un prototipo que se usa en un proyecto de restauración ecológica; biodiversidad: variedad de especies que habitan el mismo lugar; antigénico, capacidad del ecosistema para renovarse<sup>30</sup>.

Según Vargas<sup>21</sup>, para iniciar un proceso de restauración ecológica se debe seguir trece pasos descritos en la guía metodológica para la restauración del Bosque Alto Andino, el primero es delimitar el ecosistema de referencia, completando la información acerca de los sucesos ocurridos en aquel lugar, desde sus especies nativas hasta su transformación. Se continúa con la valoración de la zona, para la construcción de los objetivos y la instauración de las escalas, siguiendo este orden se debe clasificar el evento entre las categorías de disturbios que existen como disturbios antrópicos, directos, indirectos, predecible o natural. Es importante la participación de las comunidades que residen a los alrededores del ecosistema para que aporten sus ideas y su conocimiento sobre las especies o la historia del lugar, así se establece una mejor proyección sobre la restauración al mismo tiempo que se genera educación ambiental, con la información suministrada sobre las especies se puede evaluar la regeneración de estas dependiendo su ubicación y la etapa en la que se encuentra. Con los datos recolectados hasta ese punto se puede determinar los limitantes del proyecto<sup>21</sup>.

En la fase experimental, lo primero es seleccionar la especies con ayuda de la información obtenida tanto de la comunidad como de expertos en el tema, con las especies previamente seleccionadas se procede a la siembra de las semillas en el área o en viveros dependiendo la disponibilidad de recursos del proyecto, a su vez se opta por el sitio a restaurar según el estado del suelo y su nivel de alteración. Por otra parte es importante ejecutar técnicas para rebasar los limitantes. Es fundamental hacer un seguimiento del proceso para que especies exóticas no invadan el área de restauración de especies nativas evitando a toda costa su asentamiento. Por último, se consolida el proceso, ratificando un cambio óptimo en el área trabajada donde se puede observar la recuperación de las especies y/o el establecimiento de los servicios ambientales<sup>21</sup>.

## **2.2 Disturbios en los ecosistemas: Bosque Alto Andino a nivel de daños ecológicos**

Los ecosistemas son susceptibles a los disturbios, dependiendo la procedencia del disturbio se puede clasificar en disturbio natural o antrópico. El disturbio natural ocurre sin la intervención de la mano del hombre, se da naturalmente como las inundaciones, incendios forestales, huracanes, deslizamiento de tierra, entre otros; mientras que en los disturbios antrópicos el hombre es la causa, por ejemplo, la tala, extracción de materiales, uso agrícola o pecuario, descarga de contaminantes y construcciones urbanas<sup>28</sup>.

El Bosque Alto Andino ha sido afectado por disturbios antrópicos por la utilización de recursos naturales, los más comunes son quemas, plantaciones de especies exóticas, extracción de especies forestales, pastoreo, agricultura, lo que genera en el suelo pérdida de nutrientes, erosión y degradación<sup>31</sup>. En el 2007 Vargas<sup>32</sup> estudio los alrededores del embalse de Chisacá que corresponde al Bosque Alto Andino, predominado por “encenillos o *Weinmannia tomentosa*” y gran parte constituido por pastizales y cultivos de papa, arveja y haba, solo el 10% se encuentra cubierto por vegetación diferente a pastizales, la mayor parte del 10% eran especies nativas. También, se encuentran especies exóticas como “fragmentos de pino, ciprés, eucalipto y retamo”. Se determinó que la zona estudiada había sido sometida a explotación desde aproximadamente 150 años, fue utilizado de acuerdo a las necesidades económicas de la zona.

En las plantaciones de especies exóticas se ha encontrado “*Pinus patula*, *Cupressus lusitanica* y *Pinus radiata*” con diferentes niveles de representatividad, alrededor de las plantaciones también se encuentran especies nativas: “*Miconia ligustrina*, *Miconia elaeoides*, *Hesperomeles goudotiana* y *Myrcianthes leucoxylla*, entre otros” y en baja proporción “*Eucalyptus globulus* y *Acacia decurrens*” las especies exóticas se han dado por disturbios como el pastoreo, extracción de madera y la caída de árboles<sup>21</sup>.

El banco de semillas germinables del embalse de Chisacá está constituido en su mayoría por especies herbáceas, no siendo aptas para la remoción de especies exóticas ni para el pastizal, debido a que el ingreso de la semilla en el suelo se ve

dificultada por estas especies que impiden la germinación de la semilla y el establecimiento de especies arbóreas, lo que reduce el proceso de restauración ecológica. Sin embargo, cuando el banco de semillas está compuesto por especies pioneras, logra su objetivo de progresión de restauración, sobre todo en áreas que han sufrido algún tipo de disturbio, como zonas perjudicadas por potreros<sup>32</sup>.

### **2.3 PGPR y aplicaciones (cultivos agrícolas, cultivos forestales, revegetalización y restauración de coberturas vegetales).**

Para responder a ambientes con condiciones abióticas extremas, las plantas y los microorganismos han co-evolucionado desarrollando interacciones planta-microorganismo que suelen ocurrir principalmente en tres lugares de la planta: filosfera, endosfera y rizósfera. La filosfera se relaciona con las partes aéreas (tallos, hojas y flores o frutos) y la endosfera con el sistema de transporte<sup>33</sup>, la rizósfera se define como la zona del suelo que rodea las raíces de la planta, donde las características químicas y biológicas del suelo son influenciadas por las raíces<sup>34</sup>.

En la rizósfera, las interacciones dadas entre planta y microorganismo pueden ser beneficiosas, perjudiciales o neutras para las plantas, de acuerdo a las condiciones del suelo<sup>33</sup>. Aquí se hará énfasis en las interacciones benéficas, aquellas que son consideradas simbióticas y se pueden categorizar en dos tipos: la primera es una interacción mutualista, que corresponde a interacciones íntimas y en su mayoría obligadas entre microorganismos y un rango restringido de plantas huéspedes compatibles, la segunda es una cooperación, también conocida como simbiosis asociativa, y corresponde a una interacción específica y menos obligada la cual involucra a aquellas bacterias capaces de colonizar la superficie del sistema de raíces y estimular el crecimiento y la salud de la planta<sup>35</sup>.

Es importante señalar que para que exista esta simbiosis asociativa, las raíces de las plantas secretan compuestos químicos que atraen a un vasto número de comunidades

microbianas activamente metabólicas y heterógenas, dichos compuestos se conocen como exudados de raíz, y contienen un amplio espectro de compuestos químicos que modifican química y físicamente las propiedades del suelo, regulando la estructura de las comunidades microbianas. Adicionalmente, se les atribuye a dichos exudados ser fuentes de varias moléculas de señalización<sup>36,37</sup>. Las PGPR son rizobacterias que competirán por estos metabolitos y por el sitio que ocupan sobre la raíz de la planta, siendo las uniones entre las células epidérmicas y el área donde emerge la raíz los sitios más poblados<sup>36</sup>.

Las rizobacterias que actúan en esta simbiosis asociativa, o PGPR, han sido estudiadas y aplicadas para fortalecer la productividad del suelo, ya que son la fuerza dominante en el reciclaje de nutrientes y, consecuentemente, serán importantes en la fertilidad del mismo. Pueden actuar en dos lugares, dentro de las plantas donde intercambian metabolitos, a lo que se le conocerá como PGPR intracelular (iPGPR) o viviendo como rizobacterias libres, PGPR extracelular (ePGPR)<sup>35,36,38</sup>.

## **2.4 Rizobacterias fijadoras de nitrógeno (ciclo del nitrógeno, géneros, especies)**

El nitrógeno, es un elemento limitado en la nutrición de las plantas en los ecosistemas terrestres de nitrógeno usado por las plantas es el dinitrógeno atmosférico al ser convertido en una forma biológicamente disponible, que utilizarán las plantas y darán origen a amidas y aminas que constituyen la forma orgánica del nitrógeno en el suelo principal, siendo los compuestos aromáticos nitrogenados una menor parte. El nitrógeno en el suelo proviene principalmente de tres procesos: El primero es la fijación biológica del nitrógeno, aquí, las bacterias y archeas reducen el gas  $N_2$  a  $NH_3$  utilizando un complejo enzimático llamado nitrogenasa, este complejo está compuesto de enzimas conservadas como la dinitrogenasa reductasa y una dinitrogenasa, esto se puede llevar a cabo de forma independiente o mediante una relación mutualista con varias plantas leguminosas y no leguminosas. El segundo proceso es el de fijación del nitrógeno industrial se logra haciendo reaccionar el  $N_2$  con H en presencia de Hierro a



alta presión y temperatura, se conoce también como el proceso Haber-Bosch, y puede generar al final  $\text{NH}_3$ , producto que puede ser usado directamente como fertilizante o en la manufactura de otros productos fertilizantes. El último proceso es la fijación del nitrógeno proveniente de la atmósfera, que contiene pequeñas cantidades de  $\text{NH}_3$  y gases de óxidos de Nitrógeno que provienen de emisiones de suelos, océanos, desperdicios y combustibles fósiles, y son capaces de entrar al suelo gracias a la lluvia, nieve, polvo o por absorción gaseosa<sup>39,40</sup>.

Para las plantas, la forma en la que consiguen la mayor parte del nitrógeno es a través de la fijación biológica, un 83% del nitrógeno fijado proviene de las asociaciones simbióticas entre la planta y un microorganismo, estos últimos pueden ser PGPR y se conoce que los géneros que pueden hacer este tipo de asociaciones son: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Mesorhizobium*. La otra fuente de nitrógeno fijado la pueden producir microorganismos de vida libre, es decir, bacterias que no realizan simbiosis y que también se catalogan como PGPR, los géneros más conocidos son: *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y *Cyanobacteria*<sup>41</sup>.

## **2.5 Rizobacterias solubilizadoras de fósforo (ciclo del fósforo, géneros, especies)**

El fósforo es un macronutriente necesario para el crecimiento de las plantas, la disponibilidad que tienen las plantas para captarlo depende de la concentración en disolución que posea el suelo, en suelos tropicales y subtropicales el fósforo es escaso, por lo que es añadido a través de fertilizantes, en estos casos las plantas incrementan el desarrollo de las raíces para la exploración de una mayor superficie<sup>42</sup>. Al mismo tiempo, las plantas que tienen disponible el fósforo lo obtienen en forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , si el suelo está en pH ácido y  $\text{HPO}_4^{2-}$  si está en pH alcalino. Al momento de la absorción del fósforo este cambia a complejos insolubles, dependiendo la acidez o alcalinidad del suelo se convierte en fosfatos de Fe, Al o Mn o fosfatos de Ca o Mg, respectivamente<sup>43</sup>. El fósforo dispuesto en el suelo tiene tres formas: el orgánico, el inorgánico en

disolución y el inorgánico relacionado con partículas minerales, de estos el fosfato inorgánico en disolución es el que puede utilizar la planta<sup>42</sup>.

En relación con la disponibilidad de fósforo para las plantas, existen microorganismos en el suelo con la capacidad de modificar el fosfato insoluble en formas aptas para las plantas, se les denomina bacterias solubilizadoras de fósforo. Varios estudios han descritos los siguientes géneros bacterianos: “*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pantoea* y *Erwinia*”<sup>42,43</sup>. Estas bacterias tienen la capacidad de adaptarse y desarrollarse en el suelo, ubicándose en la rizosfera de la planta para promover su crecimiento (PGPR). Las PGPRs son capaces de solubilizar el fosfato inorgánico a partir de compuestos tales como fosfato bicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas, el ácido glucónico producido por *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* y *Burkholderia cepacia* es considerado el agente más usual en la solubilización de fosfato; por medio de ácidos orgánicos se puede dar la solubilización de fosfato de dos formas diferentes, por intercambio de ácido y por la constitución de complejos con iones de metales originario de la roca fosfórica<sup>43</sup>.

Por otro lado, el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo se han documentado varios medios especiales como el Pikovskaya o medio Sperber que contiene fosfato de calcio, útil para la selección de bacterias del suelo, raíces o en general, la rizosfera<sup>43</sup>. Otro medio es el medio NBRIP útil para microorganismos que solubilizan fósforo inorgánico. Estos medios deben estar suplementados para mejorar el aislamiento de las bacterias según el origen de los microorganismos, si provienen de suelos alcalinos es recomendable la adición de compuestos carbonatos de calcio, incluido la roca fosfórica, así mismo, para suelos ácidos se debe suplementar con fosfatos de aluminio y de hierro<sup>42</sup>.

Las bacterias utilizan mecanismos directos e indirectos para la transformación de fosfato insoluble en soluble, por medio de la producción de ácidos orgánicos, la

quelación de elementos que impiden la solubilización y la asimilación directa del fosfato. Aunque algunas bacterias también tienen la acción de solubilizar sin tener ácidos orgánicos, siendo el mecanismo de solubilización la producción de protones en la aceptación de  $\text{NH}_4^+$  o por su actividad respiratoria<sup>42</sup>.

El fósforo se encuentra en los depósitos de fosfato natural sometido a procesos para ser liberado como la erosión, la lixiviación, la meteorización y en algunos casos en la extracción industrial útil como fertilizante, una vez el fosfato está libre, las plantas lo pueden acoger, integrándose con la materia orgánica del suelo y vuelve a sedimentarse en minerales insolubles<sup>43</sup>. Además, el fósforo inorgánico se encuentra ligado en forma de fosfatos a otros elementos por ejemplo, calcio, hierro, magnesio y aluminio; la mayoría de este elemento está localizado en el suelo del cual entre el 15% y el 80% está en su forma orgánica, encontrado en residuos de plantas, animales y microorganismos que libran elementos como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres, el proceso de mineralización los restituye a fosfatos inorgánicos, permitiendo que regresen a la biota, donde son útiles para los organismos heterótrofos y autótrofos<sup>42</sup>.

Además, el empleo del suelo y la alteración de la vegetación de pastizales a bosques predominantes de coníferas intervienen en la disponibilidad del fósforo, no obstante estos cambios se relacionan con la reducción de la fertilidad en cuanto a la actividad fosfatasa, biomasa y el aumento de la tasa metabólica. Por otra parte, una de las aportaciones que fortalece el ciclo del fósforo en el suelo, es el recambio en los mecanismos de mineralización-inmovilización por parte de los microorganismos, en los que participa el tipo de suelo, especies vegetales y distintos factores ambientales; los microorganismos pueden liberar ácidos orgánicos aumentando la solubilización del fósforo y enzimas de actividad fosfatasa que pueden hidrolizar mono, di y tri ésteres de fosfato. Entre los microorganismos con capacidad de promover el crecimiento de plantas haciendo que los fosfatos estén disponibles están las bacterias *Bacillus*, *Enterobacter ssp.*, hongos como *Aspergillus*, *Emmericella*, *Penicillium* y hongos micorrízicos<sup>44</sup>.

## 2.6 Rizobacterias con actividad amilolítica

Las rizobacterias son conocidas por su capacidad de hidrolizar el almidón, que es una molécula presente en plantas con mayor proporción de reserva, se compone de: amilosa y amilopectina; la amilosa consta de una cadena helicoidal no ramificada de unidades de D-glucosa, mientras la amilopectina es un polímero 1,4- $\alpha$ -D-glucosa. Algunos microorganismos como *Bacillus macerans* realizan transglucosilación a partir del almidón, formando ciclodextrinas con unidades de glucosa<sup>45</sup>.

Por otra parte, la acción hidrolítica de las amilasas genera el ataque extracelular del almidón, donde la  $\alpha$ -amilasa ataca a 1,4- $\alpha$ -glicosídicos ocasiona la producción de glucosa, maltosa y oligómeros. Algunas bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* producen amilasas, así mismo se han reportado algunos hongos. Estos microorganismos excretan enzimas para hidrolizar el almidón facilitando el ingreso a la célula y que lo pueda utilizar como sustrato para el crecimiento vegetal<sup>45</sup>.

## 2.7 Metabolitos primarios y secundarios producidos por Rizobacterias

Las bacterias promotoras de crecimiento han demostrado la producción de metabolitos, entre los que se destaca las fitohormonas, la generación de sideróforos y ácido salicílico<sup>46</sup>; los sideróforos son moléculas producidas en condiciones de baja concentración de hierro que aumentan la entrada del elemento a los microorganismos, son solubles a pH neutro, un ejemplo de los microorganismos que sintetizan estos elementos son las bacterias. Algunos organismos producen péptidos no ribosomales afines con el hierro, estos péptidos retienen el hierro que está junto a otros metales, reduciéndolo a su forma soluble y fácil de captar por estos organismos<sup>46</sup>.

Por otra lado, si el microorganismo está localizado en un medio insuficiente de hierro, el mecanismo empieza desde la captura del hierro del medio, a continuación se forma el complejo hierro-sideróforo reconocido por receptores en la membrana celular, una vez

ingresa al microorganismo participa en un proceso de intercambio de ligandos que puede ser seguido por la reducción del hierro o la hidrólisis del sideróforo<sup>47</sup>.

El ácido salicílico pertenece a los compuestos fenólicos, en las plantas participa en la producción de lignina, fitoalexina (compuesto ligado a la defensa), interviene en el desarrollo de las plantas como en “la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades”<sup>48</sup>. Además, puede interferir en la obtención de otras hormonas como el ácido jasmónico, etileno y auxinas<sup>48</sup>.

Las fitohormonas ayudan al crecimiento vegetal directamente, entre estas se encuentran, el ácido indol acético perteneciente al grupo de las auxinas, el ácido giberélico, citoquininas y ácido abscísico. El ácido indol acético en presencia de triptófano puede tener concentraciones de 80 hasta 100 ug/ml, por ejemplo en *Rahnella aquatilis*, los efectos del AIA en las plantas pueden variar dependiendo de su concentración afectando la susceptibilidad de los tejidos de las plantas<sup>49</sup>.

## **2.8 Hormonas promotoras del crecimiento vegetal**

La mayoría de las plantas están propensas a distintos estreses abióticos en condiciones de campo. En la agricultura moderna de igual manera existe esta circunstancia, como niveles sub-óptimos de salinidad, sequía, enfriamiento y calor, identificándose como una limitación importante que afecta los rendimientos de los cultivos. En el 2014, Fahad et al<sup>50</sup> menciona que “el estrés salino y osmótico reduce la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de proteínas, además de inhibir el crecimiento y el desarrollo en especies sensibles”. En condiciones de frío induce en la planta marchitamiento, necrosis, inhibición del desarrollo productivo, estrés oxidativo, clorosis y disminución en la expansión de las hojas, y en aumento de la temperatura atmosférica afecta el crecimiento y rendimiento metabólico de la planta<sup>50</sup>. Aun así las

plantas tienen una respuesta favorable ante dichas adversidades como cambios en los patrones morfológicos y desarrollo, que van de la mano con ajustes de tipo metabólicos que conducen a la acumulación de diversos solutos orgánicos como polioles, prolinas, betaínas, azúcares, entre otros, que inducen a las fitohormonas, estos son compuestos dados por rutas biosintéticas de las plantas que actúan en el sitio de su biosíntesis para poder mediar respuestas de desarrollo y crecimiento de la misma. Se cree que las fitohormonas son las sustancias endógenas y críticas para modular las respuestas directas fisiológicas que conducen a la adaptación a un entorno desfavorable <sup>50,51</sup>.

Según Fahad et al<sup>50</sup>, las fitohormonas son sintetizadas por PGPR, y son capaces de estimular el crecimiento y la división celular ayudando a las plantas a ser tolerantes contra el estrés ambiental. Dentro de estas fitohormonas se encuentra: el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GA), el etileno, la auxina (ácido indol-3-acético (IAA) y las citoquininas (CK), dentro de las más importantes.

El ácido abscísico (ABA) es importante en la planta en situaciones de estrés y adaptación. ABA regula la expresión de los genes en condiciones de salinidad, además de ser crucial en las etapas del ciclo de vida de la planta, como lo son el desarrollo y latencia de sus semillas. Se conoce principalmente como hormona del estrés, ya que genera señales internas que le permiten a la planta sobrevivir a condiciones ambientales adversas. ABA actúa como un mensajero en condiciones endógenas regulando la capacidad hídrica de la planta a través de células guarda, encargadas de la transpiración de la planta, que inducen genes que codifican enzimas y proteínas que están relacionadas con la deshidratación celular por medio de las raíces de la planta, a través de xilema regulando la apertura del estoma y posterior crecimiento de las hojas, modificado por condiciones iónicas y el pH del xilema<sup>50,51</sup>.

Existe una hormona gaseosa como el etileno, que regula el desarrollo y crecimiento de la planta, esta es producida a partir de la metionina a través de S-adenosil-L-metionina y un aminoácido cíclico no proteico. Esta hormona es importante en la regulación del crecimiento vegetal y diversas respuestas al estrés<sup>50,51</sup>.

El ácido indol-3-acético (AIA), perteneciente al grupo de las auxinas, fue la primera fitohormona en identificarse, siendo esta la principal señal que regula la diferenciación vascular de las plantas, controlando así la elongación celular, la dominancia apical, el desarrollo del tejido vascular, fototropismo, gravitropismo, respuestas defensivas e importante desempeño en la formación del xilema y la raíz<sup>50,52</sup>. La biosíntesis de esta hormona vegetal no es solo exclusiva de plantas, sino también de bacterias, algas y hongos. En las bacterias, los componentes del exudado de las plantas como el triptófano son el principal precursor de para realizar la biosíntesis del AIA microbiano relevante en bacterias PGPR y en bacterias fitopatógenas. Para la planta, la cantidad de AIA da como consecuencia la sensibilidad de su tejido, asociado con vías biosintéticas que usen las bacterias, en donde se han identificado 5 de estas rutas anabólicas dependientes del triptófano por el cual la vía indol-3--piruvato (IPA) y indol-3-acetamida (IAM), son las importantes, ya que la vía IAM se ha descrito en bacterias fitopatógenas e IPA en PGPR. El efecto de las bacterias fitopatógenas como por ejemplo: *Agrobacterium spp.* y *Pseudomonas savastanoi* son “causantes de tumores en el tejido vegetal y corona de agallas, respectivamente, que en plantas jóvenes significan retrasos en el crecimiento, el desarrollo anormal, la susceptibilidad a otras enfermedades o la muerte de la planta”<sup>52</sup>. Por el contrario el efecto de las bacterias PGPR, como por ejemplo *Azospirillum* favorecen el desarrollo de la raíz<sup>52</sup>.

Las citoquininas o citocininas (CK), son relevantes en procesos importantes en la planta como lo es el crecimiento y desarrollo, división celular, dominancia apical, biogénesis del cloroplasto, senescencia de hojas, movilización de nutrientes, etc. En condiciones de alta salinidad y temperatura hay una ayuda exógena y endógena importante promocionando absorción y biosíntesis<sup>50,51</sup>.

## **2.9 Técnicas cualitativas y cuantitativas para la determinación de AIA y Amonio**

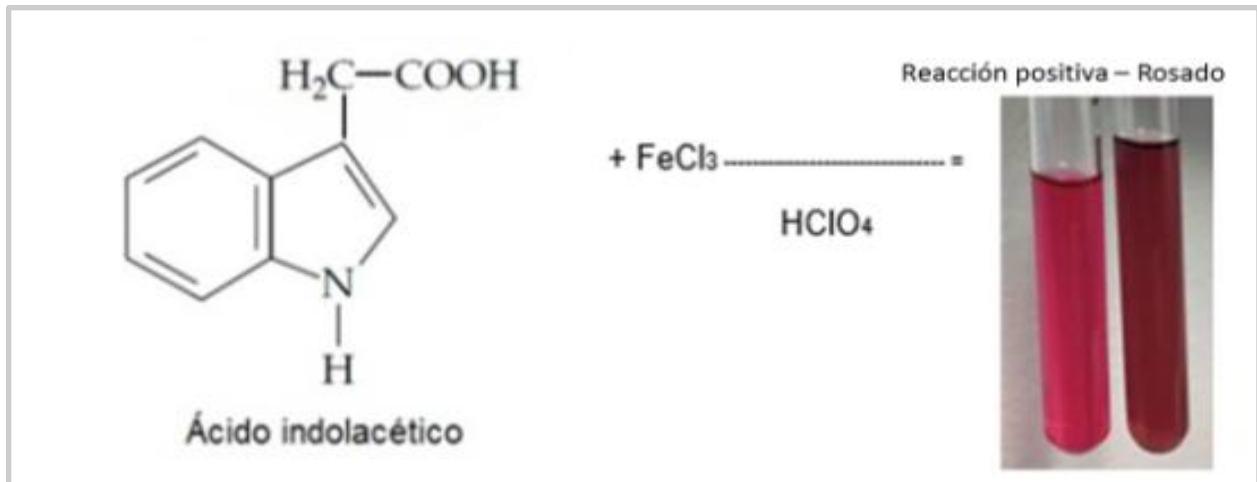
### 2.9.1 Determinación de AIA

Para la determinación de AIA existen técnicas de separación y cuantificación de esta auxina. Una de ellas es por medio de caldos de fermentación, para ello se usa la Cromatografía Líquida de Alta Resolución ó High Performance Liquid Chromatography, se ha implementado como uno de los métodos más empleados, utilizando gradientes y concentraciones de metanol, agua y ácido acético como fases móviles, además de su determinación por fluorescencia haciendo a HPLC bastante lineal, sensible, preciso y exacto<sup>53</sup>.

También se han utilizado otros métodos cromatográficos como la Cromatografía en Placa Fina, sistemas cromatográficos acoplados a Espectrometría de Masas, cromatografía de gases, método de Salkowski que se caracteriza por ser una técnica rápida, fácil y sensible en el cual las cepas son incubadas con triptófano, precursor de AIA, esta se ve evidenciada colorimétricamente en tonos fucsias a rosados por medio de lecturas en espectrofotómetro<sup>53</sup>.

La reacción observada por la adición del reactivo de Salkowski al sobrenadante de un cultivo de células libres origina un cambio en la coloración al medio a un color rojo, rosado o púrpura pálido en presencia de AIA, dependiendo de su concentración (Figura N° 1). Esto se da por la formación de un complejo entre el compuesto férrico y el indol encontrado en la muestra, en presencia del ácido sulfúrico o perclórico del reactivo. La solución con ácido perclórico (formulación clásica) es la mezcla más utilizada y la solución con ácido sulfúrico (formulación modificada) ha sido implementada con el fin de acoplar los procesos de determinación de AIA. Ambas formulaciones del reactivo de Salkowski tienen un comportamiento aceptable, aunque se ha probado que el reactivo con ácido perclórico tiene mayor sensibilidad dado que tiene mayor potencial oxidativo.<sup>53</sup>





**Figura N° 1. Reacción colorimétrica de Salkowski. GÓMEZ AVENDAÑO G, GÓNZALEZ PÉREZ D, HERNÁNDEZ VEGA J. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE RIZOBACTERIAS NATIVAS DE BOSQUE ALTOANDINO DE USME PARA USO EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA. 2017. Trabajo de grado para optar al título de Bacteriología Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.**

La aparición de color se da después de 30 minutos de incubación en condiciones de oscuridad, debido a que el AIA puede degradarse en presencia de la luz. La reacción colorimétrica se lee por espectrofotometría a una longitud de 530 nm<sup>53</sup>.

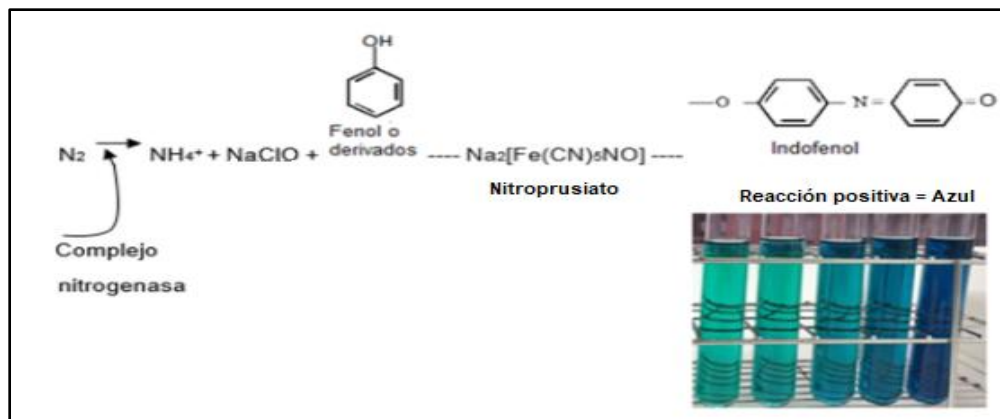
## 2.9.2 Determinación de amonio

Uno de los métodos más conocidos es el de Berthelot (fenol-hipoclorito), el cual se fundamenta en la formación de indolfenol de color azul fuerte, resultante de la reacción de ión amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) con compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante el cual puede ser hipoclorito de sodio o catalizadores como el nitroprusiato de sodio<sup>54</sup>.

### 2.9.2.1 Cuantificación de nitrógeno fijado in vitro

El nitrógeno disponible en la atmósfera no puede ser tomado directamente por las plantas, debido a que estas carecen de las enzimas necesarias para romper el triple enlace de esta molécula. Por esto es necesario el proceso de fijación del nitrógeno,

llevado a cabo por algunas bacterias, para que las plantas puedan captar y aprovechar el nitrógeno como nutriente en forma de amonio o nitritos. La cantidad de nitrógeno fijado in vitro por parte de un cultivo bacteriano se puede determinar mediante la cuantificación del ion amonio producido, debido a que la presencia de este ion indica que hubo un proceso de reducción del nitrógeno gaseoso a amonio. Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol (Figura N° 2), que resulta de la reacción del ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) con los compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante el cual puede ser hipoclorito de sodio u o-fenol; y la presencia de un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino<sup>39</sup>.



**Figura N° 2 Método colorimétrico fenol-hipoclorito. GÓMEZ AVENDAÑO G, GÓNZALEZ PÉREZ D, HERNÁNDEZ VEGA J. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE RIZOBACTERIAS NATIVAS DE BOSQUE ALTOANDINO DE USME PARA USO EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA. 2017. Trabajo de grado para optar al título de Bacteriología Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.**

## 2.10 Efectos antagónicos en bacterias simbióticas y no simbióticas

La habilidad de las rizobacterias para producir metabolitos que contribuyen a su antibiosis ha sido estudiada en la investigación de las PGPR. Estas bacterias producen compuestos con actividad antimicrobiana, usados por la planta como sistema de

defensa. Estos compuestos incluyen; antibióticos, ácido láctico, agentes líticos, numerosos tipos de exotoxinas y bacteriocinas<sup>55</sup>.

Uno de los mecanismos más conocidos es la producción de sideróforos, los cuales le confieren ventajas a las PGPR que colonizan las raíces sobre otros microorganismos de su nicho. Bajo altas condiciones competitivas, la habilidad para adquirir hierro por medio de sideróforos podría determinar el resultado de la competencia por diferentes fuentes de carbono que están disponibles o que provienen de la exudación de la raíz o la rizodeposición<sup>55</sup>.

Otro compuesto ampliamente estudiado son las bacteriocinas. Comúnmente, poseen un espectro de destrucción relativamente estrecho y solo son tóxicas para las bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora. Casi todas las bacterias pueden producir al menos una bacteriocina, y muchas bacteriocinas aisladas de bacterias gramnegativas parecen haber sido creadas por recombinación entre las bacteriocinas existentes<sup>42</sup>.

## **2.11 Tipos de fermentación líquida para la producción de biomasa microbiana**

La fermentación líquida requiere de dos factores principalmente, la aireación y la agitación; la aireación genera el aumento en las concentraciones de las células y dispone la oxigenación al cultivo, mientras que la agitación posibilita la transferencia de nutrientes así como la repartición de oxígeno, no obstante la aireación produce un incremento en los costos por la energía que se requiere y por el mantenimiento de las condiciones del equipo, pero esta debe estudiarse porque no siempre un aumento en la concentración celular es por un aumento en la aireación, teniendo en cuenta que favorece el crecimiento de especies aeróbicas<sup>56,57</sup>.

Uno de los tipos de fermentaciones líquidas es la de tipo sumergida, la cual se basa en el sumergimiento del microorganismo en una solución que posea los nutrientes

necesarios para su desarrollo. Se ejecuta en fermentadores que pueden llegar hasta 1000 metros cúbicos, es común los procesos de fermentación por lote o fermentación continua donde los nutrientes se adicionan a la misma velocidad de flujo que la del caldo que sale del flujo, a diferencia de la fermentación discontinua donde los nutrientes se agregan durante el desarrollo de la biomasa. Es indispensable revisar los parámetros de temperatura, pH, oxígeno y dióxido de carbono en el proceso de fermentación <sup>57</sup>.

Esta técnica de fermentación emplea sustratos en forma líquida como los caldos de melaza, estos sustratos se gastan rápidamente, entonces se deben reemplazar o suplementar con los nutrientes necesarios, este tipo de fermentación es adecuada para microorganismos como las bacterias, las cuales necesitan niveles altos de humedad. Además, esta técnica facilita la recolección de los productos al final del proceso, siendo útil en la obtención de metabolitos secundarios que se utilizan de forma líquida. Es importante la selección de los sustratos debido a que interfieren en los resultados por la acción que ejerce cada microorganismo en estos, varios de los sustratos más comunes en fermentación líquida son melaza, azúcares solubles, medios líquidos, jugos de fruta o vegetales <sup>58</sup>.

Así mismo, en la fermentación discontinua se inocula al inicio los nutrientes y la bacteria, en el proceso no se adiciona otra sustancia, excepto oxígeno, agentes antiespumantes y ácidos o bases que modifican el pH. Los componentes del medio, la concentración de biomasa y/o metabolitos cambio de acuerdo al metabolismo del microorganismo donde se evidencia las cuatro fases: latencia, logarítmica, estacionaria y de muerte <sup>59</sup>.

## **2.12 Técnicas de conservación de microorganismos**

A través del tiempo se ha evidenciado la importancia de preservar microorganismos para fines de progreso y desarrollo científico, por consiguiente ha surgido la necesidad

de mantener y disponer de cultivos microbianos de calidad para poder hacer uso de ellos en cualquier circunstancia<sup>60</sup>.

En los métodos de conservación existen diferentes aspectos fundamentales para garantizar la pureza del microorganismo, como los costos del procedimiento, materiales, estabilidad genética al final de la conservación de los aislamientos, pureza y mantenimiento de más del 70% de las células viables. Para ello se necesita elegir el método más apropiado para preservar características de interés del microorganismo a aislar. Dentro de los métodos de conservación existen principalmente la congelación y liofilización; sílica gel, arcilla y arena; y transferencia periódica, haciéndolos dependientes del tiempo en el que se desea preservarlos<sup>60</sup>.

Para los métodos de largo plazo se usan las metodologías de liofilización y congelación. En estos métodos se utilizan temperaturas bajas, sin embargo, difieren que la liofilización emplea un liofilizador comercial y un criopreservante en inóculos preparados en solución salina conservado a 4°C; mientras que, en la congelación se emplea como preservante el glicerol en diferentes concentraciones dependiendo de la técnica que se quiera emplear junto con el inóculo preparado en solución salina en -80°C. Ortiz T. et al<sup>61</sup>, concluye que ambos métodos son eficaces, en cuanto a viabilidad de células y pureza, sin embargo se sugiere no aplicar esta metodología en preservaciones mayores al año<sup>60,61</sup>.

En cuanto a los métodos de mediano plazo las metodologías más conocidas son arena estéril, sílica gel y arcilla. La arena se usa especialmente para la preservación de hongos, en donde se esteriliza la arena previamente en viales, se introduce el inóculo y se ajusta en cámara. Con la sílica gel, se usa también viales estériles, en donde se ajusta el inóculo en cámara de Neubauer en sílica. Con la arcilla se ajusta el inóculo en cámara de Neubauer con sílica y se agrega por encima algodón, y posteriormente perlas de arcilla inoculadas previamente. Todas las técnicas almacenadas a 4 ° C y no por un tiempo mayor a 6 meses<sup>61</sup>.

Para preservar a corto plazo se usa la técnica de transferencia periódica que consiste en la transferencia periódica del cultivo en un medio líquido o sólido y su incubación a temperatura adecuada hasta la obtención del crecimiento. Esta técnica no es recomendada para conservación de microorganismos debido a que algunos de estos pierden propiedades específicas de algunos microorganismos<sup>61</sup>.

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

Nuestro tipo de diseño metodológico se basó en el modelo descriptivo. En donde se evaluó las características de las rizobacterias aisladas del suelo de Usme para poder observar su efecto promotor de crecimiento vegetal mediante la evaluación de su fijación de nitrógeno y producción de AIA.

#### 3.1 Universo, población, muestra

**-Universo:** en este trabajo de investigación el universo comprendido son las bacterias presentes en el suelo del Bosque Alto Andino de Colombia.

**-Población:** Bacterias presentes en suelo tomado de la zona de restauración del corredor Chingaza – Sumapaz , que hace parte del bosque Altoandino ubicado en el parque eco tecnológico de la Universidad Antonio Nariño Sede Usme coordenadas 4°28'58.5"N 74°07'15.5"W.

**-Muestra:** Bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias amilolíticas, solubilizadoras de fósforo y con características ácido lácticas, por otra parte hongos levaduriformes presentes en muestras de suelo rizosférico de la zona de restauración.

#### 3.2 Hipótesis, variables, indicadores

##### 3.2.1 Hipótesis

Existen Rizobacterias no antagónicas en el suelo del Bosque alto andino productoras de metabolitos que promueven el crecimiento de plantas nativas para ser usadas en restauración de suelos

### 3.2.2 Tabla de Variables e indicadores

Variable	Tipo de variable	Indicador
Suelo del Bosque Altoandino	Independiente	Sitio toma de muestra
Medios de cultivo selectivos	Independiente	Formulaciones de medios de cultivo
Cantidad de metabolitos PGPR	Dependiente	Producción de Ácido Indol Acético
		Producción de amilasas
		Producción de amonio
Antagonismo entre cepas seleccionadas	Dependiente	Inhibición del crecimiento entre cepas seleccionadas

Tabla N°1. Variables e indicadores del proyecto.

### 3.3 Técnicas y procedimientos

#### 3.3.1 Aislamiento de las rizobacterias

La recolección de la muestra de suelo se hizo en el Bosque Alto Andino en la localidad de Usme. Estas se inocularon en caldo tripticasa soya como medio de enriquecimiento a 30°C en agitación a 50 rpm y se incubaron por un tiempo de 48 a 72 horas. A estos caldos se les realizó diluciones seriadas para después sembrar en medios selectivos



como SMRS-1 para solubilizadores de fosfato, Cetrimide y King B para el aislamiento de *Pseudomonas*, Almidón para observar producción de amilasas, MRS para bacterias ácido lácticas y NFB para evaluar la actividad reductora de acetileno, como indicativo de la fijación de nitrógeno (Anexo N°1).

### **3.3.2 Selección de cepas**

De cada cultivo selectivo se tomaron diferentes colonias de acuerdo a sus características macroscópicas y la actividad que ejerció en el medio donde fue sembrado, como el cambio de color por la producción de un metabolito y un repique de cada una de ellas asignándoles un código de acuerdo a su dilución y medio de cultivo.

### **3.3.3 Cuantificación de ácido indol acético**

En la determinación de Ácido Indol Acético (AIA), se realizó la curva de calibración (Figura N° 3) en donde se usó una solución AIA de 20 ml a 100 µg/ml como solución madre, para preparar soluciones de concentraciones 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2 y 0 µg/ml. Posteriormente se adicionó 2 ml del reactivo de Salkowsky que contiene FeCl<sub>3</sub> y ácido sulfúrico 7.9 M, para dejarlo reaccionar por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realiza las lecturas en el espectrofotómetro a 540nm por triplicado. Estas se ven evidenciadas colorimétricamente en tonos fucsias a rosados.

Para la evaluación de las cepas se elaboró un inóculo con una colonia obtenida de los medios selectivos empleados ajustado a una densidad óptica de 0.20 absorbancias a 600nm en solución salina al 0.85%, se tomó 100µl del inóculo y se adicionaron en 10 ml de caldo LB suplementado con triptófano, se incubó a 30°C, 150 rpm durante 72 horas en ausencia de luz. Transcurrido ese tiempo se toma 1 ml del sobrenadante y se mezcla con 2 ml del reactivo de Salkowsky, se deja 30 minutos para efectuar la reacción y se realiza las lecturas a una absorbancia de 540 nm con un blanco de reactivo de Salkowsky y caldo LB, las lecturas se realizan por triplicado<sup>62</sup> (Anexo N°2).



Figura N° 3. Curva de calibración de ácido indol acético. Calderón S, López V , Peña Y , 2019

### 3.3.4 Cuantificación de amonio

La cuantificación de amonio se basa en la técnica colorimétrica fenol-hipoclorito de Berthelot<sup>54</sup>. Antes de la prueba, se realizó la curva de calibración que consiste en la elaboración de un patrón de cloruro de amonio de 100  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de diluciones con concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{g/ml}$ . A cada concentración se le adiciona 0.4ml de solución alcohólica de fenol al 10%, 0.4ml de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 1.0 ml de solución oxidante. Se dejó en reposo durante una hora, el cambio en las concentraciones se evidenció por una coloración azul (figura N°4). Luego, se realizó la lectura de la absorbancia a 632 nm en el espectrofotómetro Jenway 632OD<sup>54</sup>. La curva se obtiene en el programa Excel 2016.

Para la evaluación de las cepas, se elaboró caldo extracto de suelo al 10% de la siguiente forma: primero, se depositó la muestra de suelo de Usme en un beaker de 250ml con agua destilada, aparte se preparó solución salina al 0.85%. El erlenmeyer con desprendimiento lateral 500 ml se unió a la bomba de vacío, en la base de este se colocó el embudo buchner con papel filtro, a continuación se colocó la muestra de

suelo para ser filtrada en el erlenmeyer con la solución salina. Al finalizar la filtración se agregó 0.5g/L de extracto de levadura y 1.0g/L de sacarosa. Se agregó 0.5ml de caldo y 4.5ml de agua destilada en cada tubo. Se esterilizó a 120°C.

Después, se inoculó cada cepa en su tubo respectivo para posteriormente incubar a 30°C por 72 horas a 150 rpm. A continuación, se agregó 15 ml KCL 2M en cabina de flujo laminar, se dejó por 1 hora en agitación seguido de 1 hora en reposo. Luego, se tomaron 10 ml del sobrenadante y se centrifugaron 20 minutos a 2000 rpm, el sobrenadante se colocó en otros tubos para adicionar los reactivos usados en la curva de calibración y generar la misma reacción colorimétrica<sup>54</sup>. Las lecturas se realizaron por triplicado por el método de espectrofotometría (Anexo N°3).



Figura N° 4. Curva de calibración de amonio. Calderón S, López V, Peña Y, 2019

### 3.3.4 Oxidasa y catalasa

Se seleccionaron 38 cepas con las condiciones de mayor concentración de ácido indol acético, de amonio, crecimiento en los medios de cultivo y selección por morfología macroscópica y microscópica, pruebas de oxidasa y catalasa, para conservar en glicerol 50% en tubos eppendorf, este procedimiento bajo cabina de flujo laminar<sup>63</sup>.

### **3.3.5 Conservación de cepas**

Se seleccionaron las cepas con las condiciones de mayor concentración de ácido indol acético, de amonio, crecimiento en los medios de cultivo y selección por morfología macroscópica y microscópica, pruebas de oxidasa y catalasa, para conservar en glicerol 50% en tubos eppendorf, este procedimiento bajo cabina de flujo laminar <sup>63</sup>.

### **3.3.6 Viabilidad y pureza**

Para verificar que las cepas no se encuentren contaminadas y continúan con sus características originales, a partir de los tubos de caldo tripticasa soya, en donde se sembró 100µl en los medios selectivos, con la temperatura y el tiempo determinado y ajustado para cada cepa. Se evaluó la pureza mediante tinción de Gram <sup>64</sup>.

### **3.3.7 Antagonismo**

Las pruebas de antagonismo se basaron en la técnica de difusión en agar modificada por el método de Kirby Bauer <sup>65</sup>, a partir de un tubo con caldo BHI con la cepa, con un hisopo estéril se hizo una siembra masiva en agar selectivo para cada bacteria, utilizando discos de papel estériles, los cuales se impregnaron con la cepa a enfrentar y se colocaron en los medios selectivos de a cuatro por medio, incubando de acuerdo a sus condiciones específicas para posteriormente leer los halos de inhibición (Anexo N°4 ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Aislamiento de rizobacterias

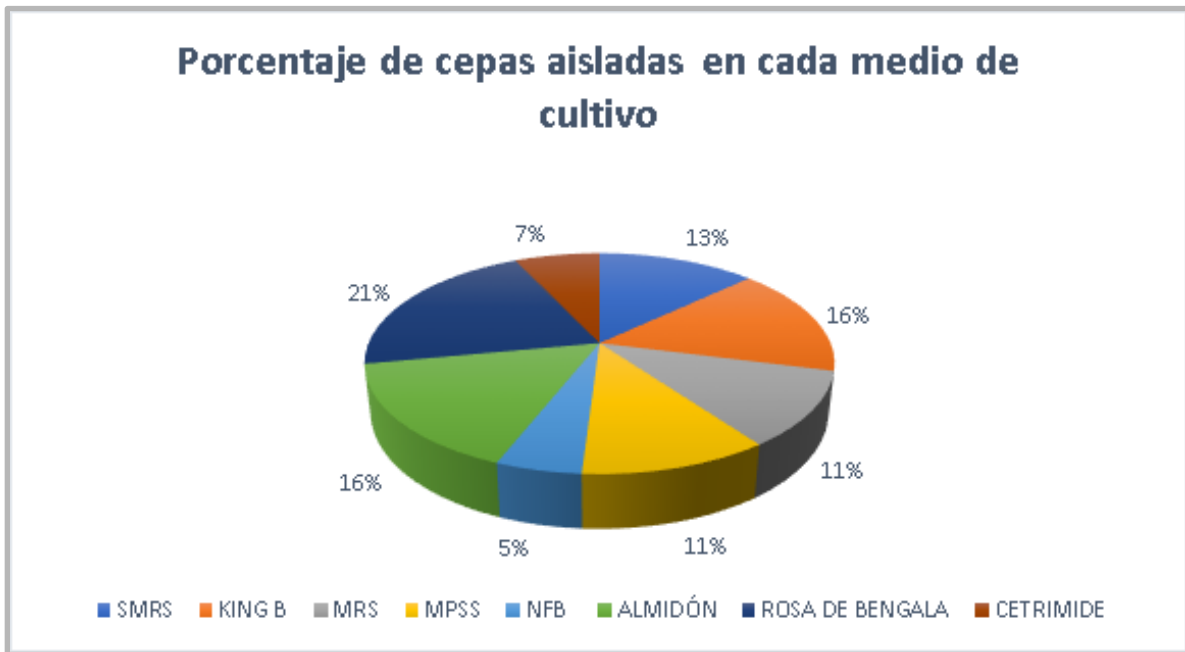
A partir de las diluciones seriadas realizadas con la muestra de suelo, se hizo una siembra masiva en diferentes medios de cultivo selectivos (Figura N°5). Para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato se utilizaron los medios SMRS, para aislar lactobacilos se usó el medio MRS, para levaduras se usó el medio Rosa de Bengala, para detectar bacterias amilolíticas se usó Agar Almidón y para bacterias Fijadoras de Nitrógeno, se usaron los agares MPSS, King B, cetrimide y NFB.

Se purificaron de la muestra de suelo un total de 38 cepas. A cada cepa se le asignó un código de acuerdo a la sigla del medio de cultivo del que fue aislado junto con un número, antecedido por las siglas RB, de rizobacterias (Tabla N° 2). De estas, 8 (21%) fueron aisladas del medio de cultivo Rosa de Bengala (RB), 3 (7%) del medio Cetrimide (C), 5 (13%) del medio SMRS (SM), 6 (16%) de almidón (AL), 6 (16%) de King B (KB), 4 (11%) de MRS, 4 (11%) de MPSS (MP) y 2 (5%) de NFB (Gráfica N°1).

Rizobacterias aisladas del Parque Eco Tecnológico UAN						
Número	Medio de Cultivo	Código de la cepa		Número	Medio de Cultivo	Código de la cepa
1	Rosa de Bengala	RB-RB5		20		RB-AL23
2		RB-RB15		21		RB-ALX
3		RB-RB24,2		22		RB-AL25
4		RB-RB304		23	king B	RB-KB23
5		RB-RB24		24		RB-KB103
6		RB-RB32		25		RB-KB33
7		RB-RB103		26		RB-KB25

8		RB-RB43
9	Cetrimide	RB-C23
10		RB-C35
11		RB-C25
12	SMRS	RB-SM13
13		RB-SM34
14		RB-SM23
15		RB-SM1
16		RB-SM01
17	Almidón	RB-AL24
18		RB-AL33
19		RB-AL13

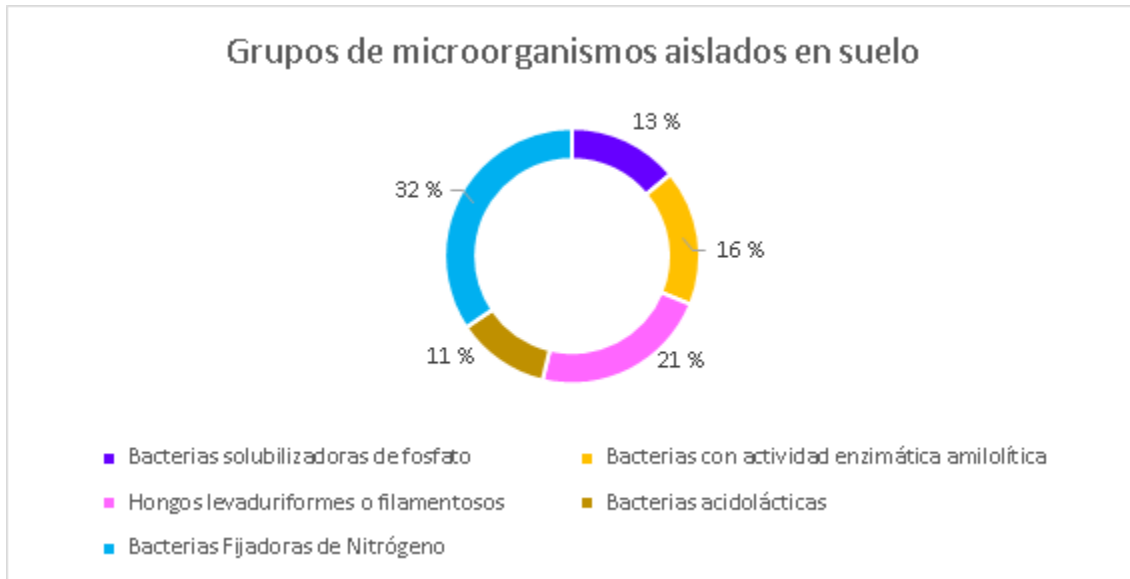
27		RB-KB13
28		RB-KB304
29	MRS	RB-MRS14
30		RB-MRS13
31		RB-MRS2
32		RB-MRS24
33	MPSS	RB-MP14
34		RB-MP15
35		RB-MP34
36		RB-MP24
37	NFB	RB-NFB102
38		RB-NFB103



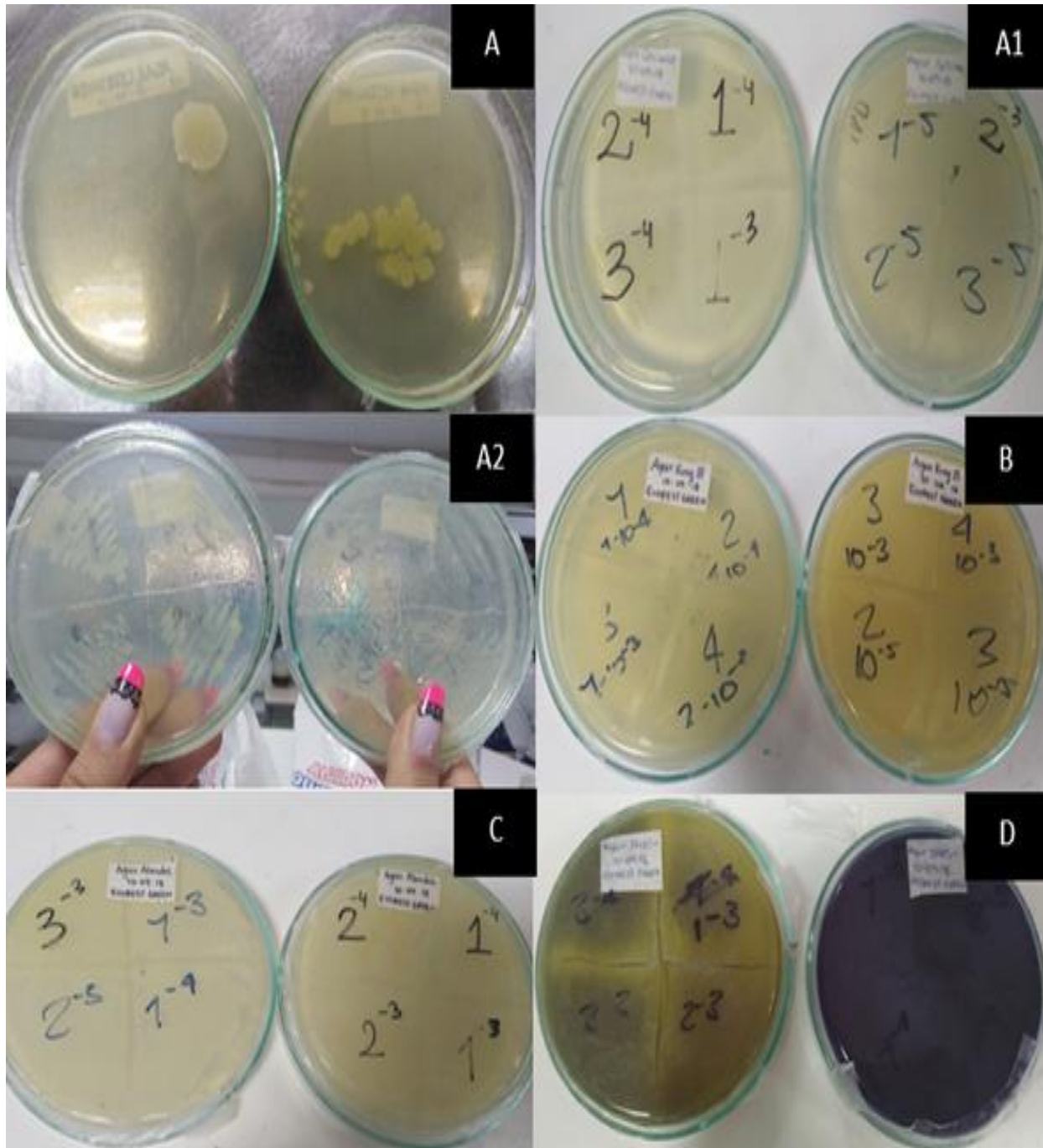
**Tabla N°2.** Rizobacterias aisladas del Parque Eco Tecnológico UAN con sus respectivos códigos.

**Gráfica N°1. Porcentaje de cepas por medio de cultivo** Calderón S, López V, Peña Y, 2019

El mayor porcentaje de cepas aisladas fueron las bacterias solubilizadoras de fosfato, con una frecuencia del 32%, seguidas por las cepas tipo Hongo con un 21%. Aquellas cepas cuyo aislamiento fue menor, fueron las Solubilizadoras de Fosfato con un 11% (Gráfica N°2).



**Gráfica N° 2. Tipo de cepa aislada según sus características** Calderón S, López V, Peña Y, 2019



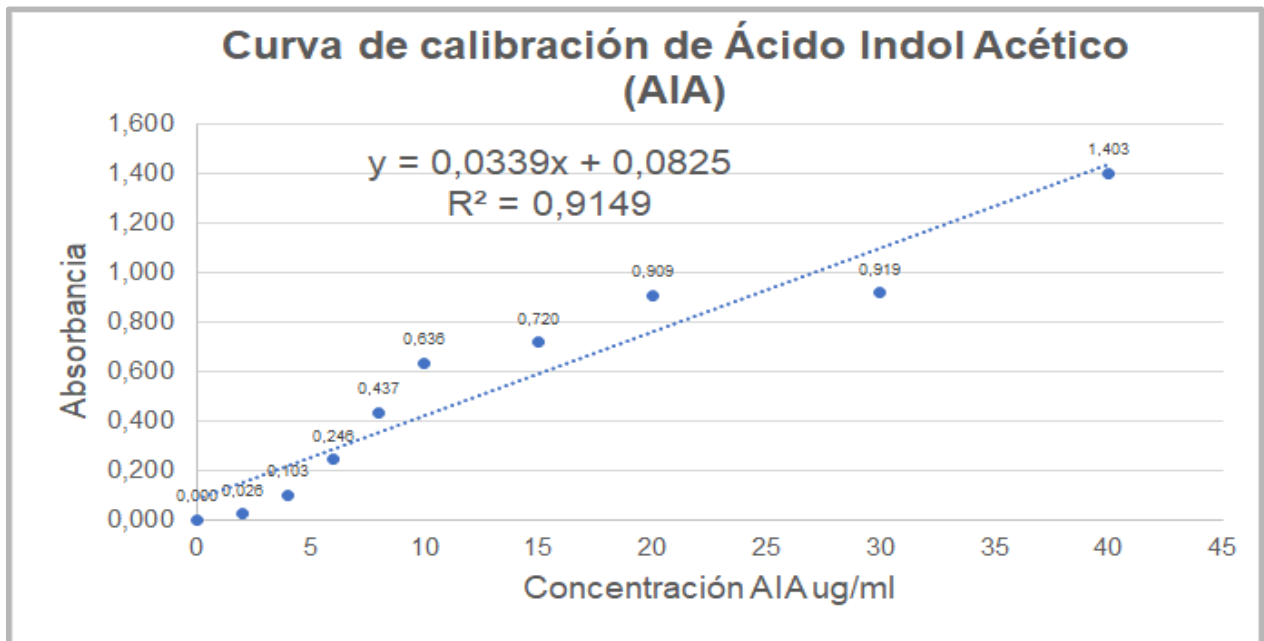
**Figura N° 5. Aislamientos de Rizobacterias en medios selectivos.** (A) Diferentes morfotipos de la siembra de rizobacterias en dilución  $10^4$  en agar Cetrimide. (A1) Aislamiento de diferentes morfotipos en agar Cetrimide cara reversa. (A2) Aislamiento de diferentes morfotipos en agar Cetrimide cara anversa. (B) Aislamiento de diferentes morfotipos en agar King B cara reversa. (C) Aislamiento de diferentes morfotipos en agar Almidón cara reversa. (D) Aislamiento de diferentes morfotipos en agar SMRS-1 cara reversa. Calderón S, López V, Peña Y, 2019.



## 4.2 Cuantificación de AIA y Amonio

La obtención de la concentración del ácido indol acético y amonio, se realizó a través de una curva de calibración, la curva de calibración para AIA se determinó con un coeficiente de correlación ( $R^2$ )= 0.9149, siendo los resultados confiables para el desarrollo de las concentraciones de las cepas de rizobacterias aisladas en el suelo de Usme.

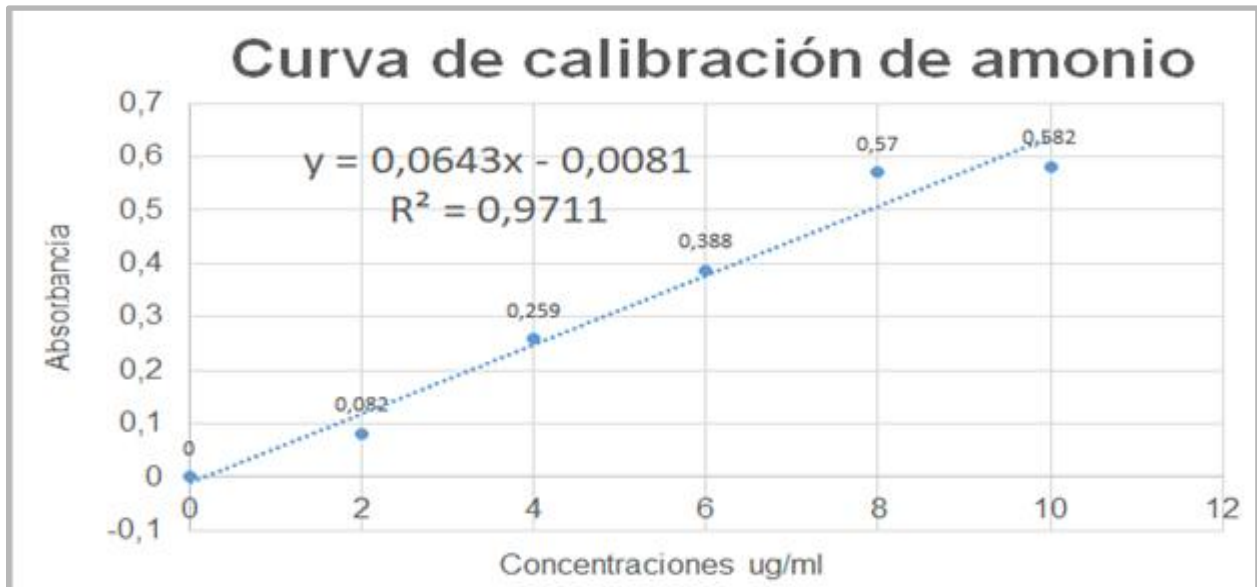
Los valores de la producción de AIA por parte de las rizobacterias fueron calculados a partir de la curva patrón (Gráfica N°3), obtenida mediante regresión lineal cuya ecuación equivale a  $y=0.0339x + 0.0825$ , con un valor de  $R^2 = 0.9149$  que indica que la ecuación puede ser usada para determinar las concentraciones (Anexo N°5).



Gráfica N°3. Curva de calibración de Ácido Indol Acético. Calderón S, López V, Peña Y, 2019

La curva de calibración de amonio representada en la gráfica número 5, obtenida mediante regresión lineal cuya ecuación equivale a  $y= 0.0643x - 0.0081$ , con un valor

de  $R^2 = 0.9711$  siendo óptima para leer las concentraciones de amonio de las cepas de rizobacterias. (ver anexo N°6 )



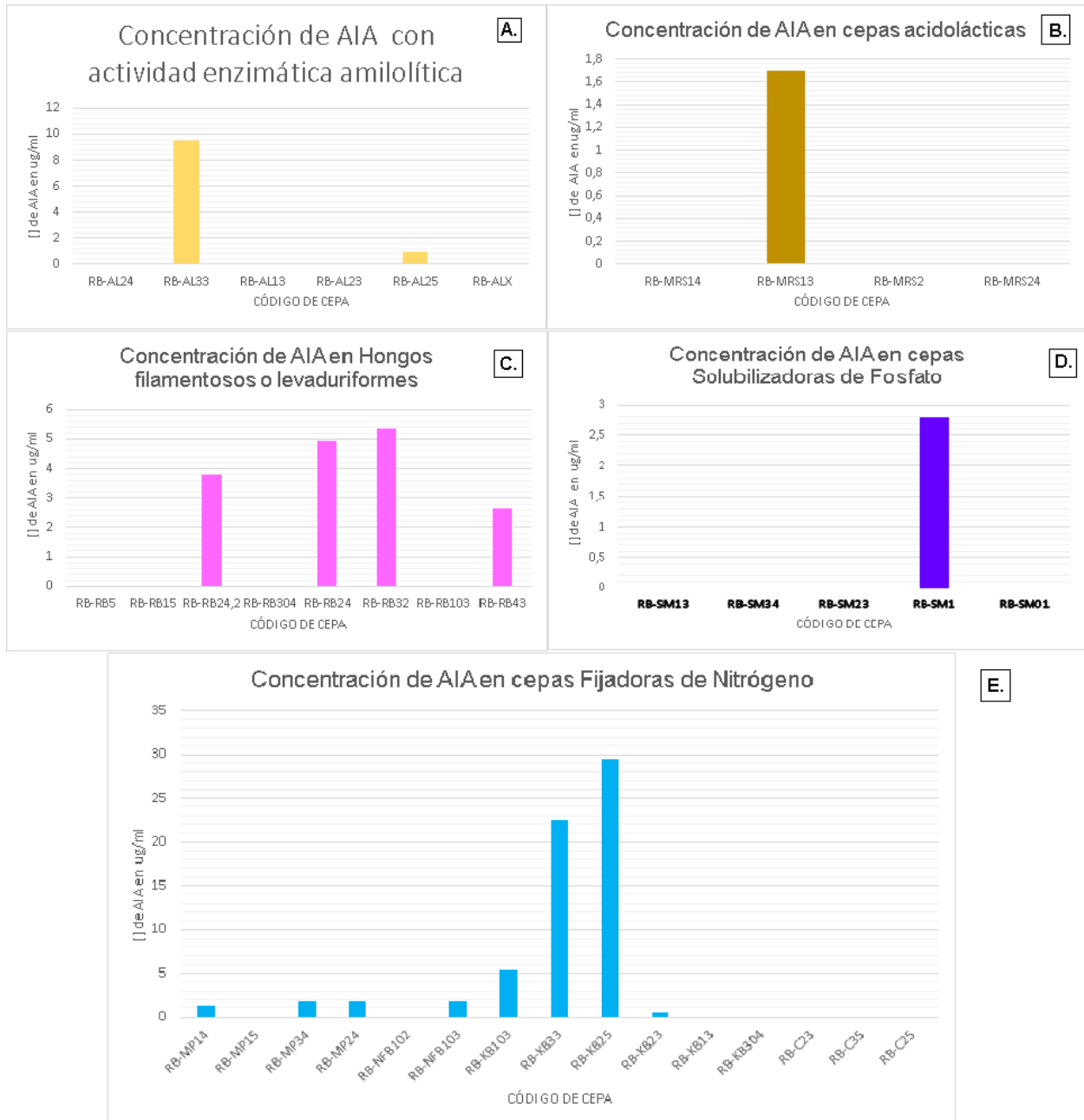
Gráfica N°5. Curva de calibración de amonio. Calderón S, López V, Peña Y, 2019

#### 4.2.1 Concentración de ácido indol acético

El ácido indol acético conocido por ser una auxina que promueve el crecimiento de raíces, ramas y frutos en las plantas, fue medido por la técnica de Salkowsky en todas las cepas aisladas del suelo de Usme (Anexo N° 7) donde cada cepa está con su respectiva concentración, como control positivo las cepas utilizadas fueron *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida*.

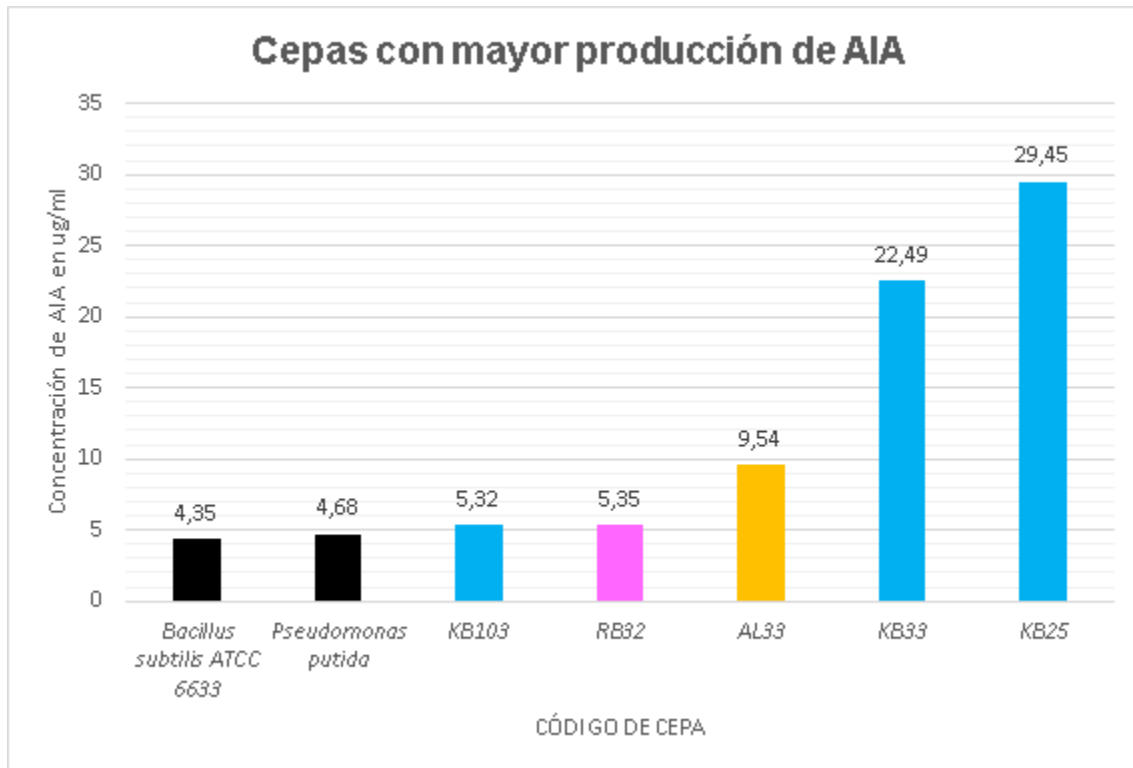
Se hizo un análisis de las concentraciones de AIA en las categorías de cepas planteadas anteriormente, de aquí se seleccionaron aquellas que produjeron una concentración de analito superior a la detectada en los controles positivos (Gráfica N°6). En las Amilolíticas (Gráfica N°6A), se destaca la cepa RB-AL33, la cual mostró una concentración de AIA de 9,57 ug/ml, para el caso de las cepas que crecieron en agar sabouraud para hongos filamentosos y levaduriformes (Gráfica N°6C) y en la

categoría de fijadores de nitrógeno, cuatro cepas mostraron una concentración de AIA mayor a 1,3µg/ml, siendo la RB-MP34 la mayor productora con 1,8µg/ml.



**Gráfica N°6. Producción Ácido Indol Acético (AIA) en las rizobacterias aisladas.** Calderón S, López V, Peña Y, 2019

Las cepas que no presentaron concentración de AIA (Gráfica N°7) son: RB-RB5, RB-RB15, RB-RB304, RB-RB103, RB-MP15, RB-NFB102, RB-MRS14, RB-MRS2, RB-MRS24, RB-KB13, RB-KB304, RB-C23, RB-C35, RB-C25, RB-AL24, RB-AL13, RB-AL23, RB-ALX, RB-SM13, RB-SM34, RB-SM23 y RB-SM01.



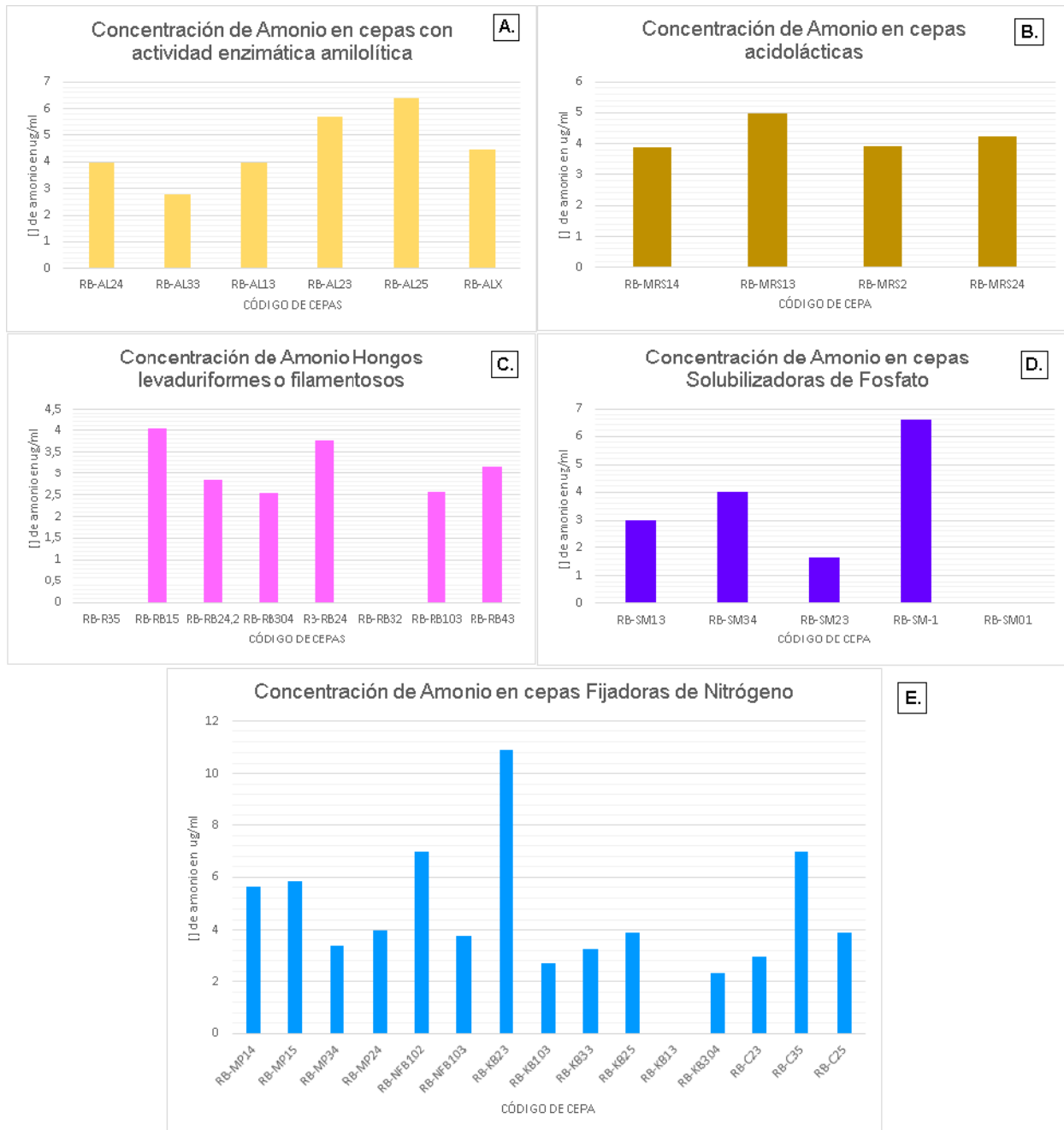
**Gráfica N°7. Cepas con mayor producción de Ácido Indol Acético (AIA).** Cepas con mayor producción de Ácido Indol Acético. Controles positivos: *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida*. Control negativo: solución alcohólica de fenol al 10%, nitroprusiato de sodio al 0.5% y solución oxidante.

Calderón S, López V, Peña Y, 2019

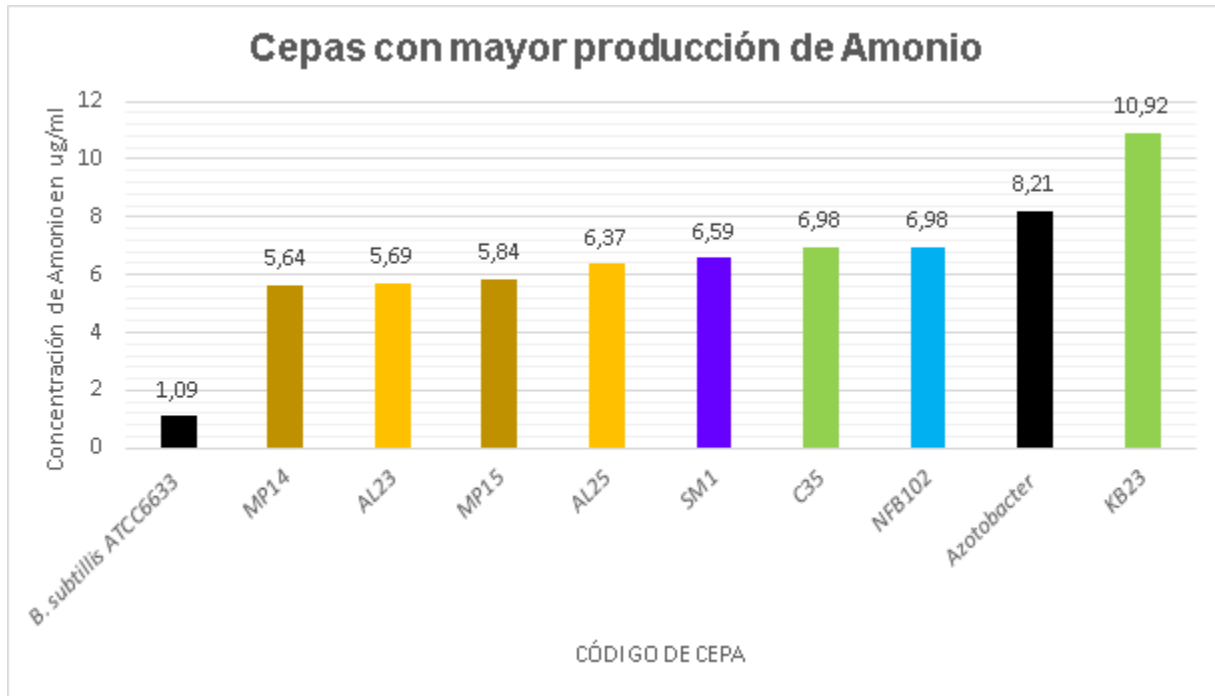
#### 4.2.2 Concentración de amonio

A todas las cepas se les realizó la concentración de amonio. En donde solo 4 cepas no mostraron producción (Gráfica N° 8). Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus*

*subtilis* y *Azotobacter*. Las cepas con mayor producción de amonio fueron: RB-C35, RB-SM-1, RB-AL23, RB-AL25, RB-KB23, RB-MP14, RB-MP15 y RB-NFB102 (Gráfica N°9), indicando que estas cepas pueden promover el crecimiento de las plantas gracias a este elemento (Anexo N° 8).



**Gráfica N°8. Producción Amonio.** Cepas de rizobacterias aisladas por producción de Amonio. Intervalos de <1, 1-2, 2-3, 3-4 y >5. Calderón S, López V , Peña Y , 2019



**Gráfica N°9. Cepas con mayor producción de Amonio.** Cepas con mayor producción de Amonio. Controles positivos: *Bacillus subtilis* y *Azotobacter*. Control negativo: Reactivo de Salkowsky. Calderón S, López V , Peña Y , 2019

### 4.3 Oxidasa y catalasa

### 4.4 Caracterización morfológica

La identificación microscópica se realizó por medio de la tinción de Gram diferenciando morfología bacteriana y afinidad a la coloración de Gram (Anexo N°9), con ayuda de las pruebas de oxidasa y catalasa (Tabla N° 3).

<b>Código de Cepa</b>	<b>Coloración de Gram</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Características Macroscópicas</b>
<b>RB-RB5</b>	*	-	+	Colonia grande, blanca, cremosa, convexa, regular, brillante
<b>RB-RB15</b>	*	+	-	Colonia grande, blanca, cremosa, convexa, regular, brillante
<b>RB-RB24.2</b>	*	-	+	Colonia cremosa, grande, convexa, beige, regular
<b>RB-RB24</b>	*	-	+	Colonia cremosa, grande, convexa, beige, regular
<b>RB-RB103</b>	*	-	-	Colonia pequeña. redonda, cremosa, convexa, color beige con centro café, regular
<b>RB-RB43</b>	*	-	+	Colonia irregular, color beige oscuro, sin bordes, cremosa, brillante, convexa
<b>RB-C23</b>	Bacilos Gram negativos	-	-	Colonia amarilla, cremosa, convexa, grande, brillante
<b>RB-C35</b>	Bacilos Gram negativos	+	+	Colonia irregular, pequeña, blanca, lisa, brillante
<b>RB-SM23</b>	Bacilos Gram negativos	+	-	Colonia café oscuro, pequeña, redonda, regular, convexa
<b>RB-SM-1</b>	Cocos Gram positivos	-	+	Colonia gris, pequeña, redonda, regular, convexa
<b>RB-SM01</b>	Bacilos Gram positivos	-	+	Colonia gris, grande, redonda, regular, convexa
<b>RB-AL33</b>	Bacilos Gram negativos	+	+	Colonia grande, blanca, irregular, lisa.
<b>RB-AL23</b>	Bacilos Gram	-	+	Colonia irregular, grande, blanca, lisas

	negativos			
<b>RB-ALX</b>	Bacilos Gram positivos	-	-	Colonia grande, café, irregular, lisa
<b>RB-AL25</b>	Bacilos Gram positivos	-	+	Colonia irregular, grande, blanca, lisas
<b>RB-KB23</b>	Bacilos Gram positivos	-	+	Colonia pequeña, blanca, irregular, rugosa
<b>RB-KB 103</b>	Bacilos Gram negativos	-	+	Colonia regular, grande, bordes lisos, color blanco con halo beige
<b>RB-KB33</b>	Coco bacilos Gram negativos	-	-	Colonias pequeñas, regulares, cremosas, lisas, convexas
<b>RB-KB25</b>	Bacilos Gram negativos	-	+	Colonia irregular, convexa, cremosa, rugosa, color curuba, grande
<b>RB-KB23</b>	Coco bacilos Gram negativos	-	+	Colonia irregular, grandes, convexas, cremosas, lisas, blancas con halo beige
<b>RB-KB13</b>	Coco bacilos Gram negativos	-	+	Colonia regular, grande, bordes lisos, color blanco con halo beige
<b>RB-KB304</b>	Coco bacilos Gram negativos	-	-	Colonia pequeña, cremosas, lisas, regulares
<b>RB-MRS13</b>	Coco bacilos Gram negativos	+	+	Colonias pequeñas, convexas, rosadas, regulares, sin borde o halo
<b>RB-MRS24</b>	Cocos Gram positivos	+	-	Colonia rosada, grande, convexa

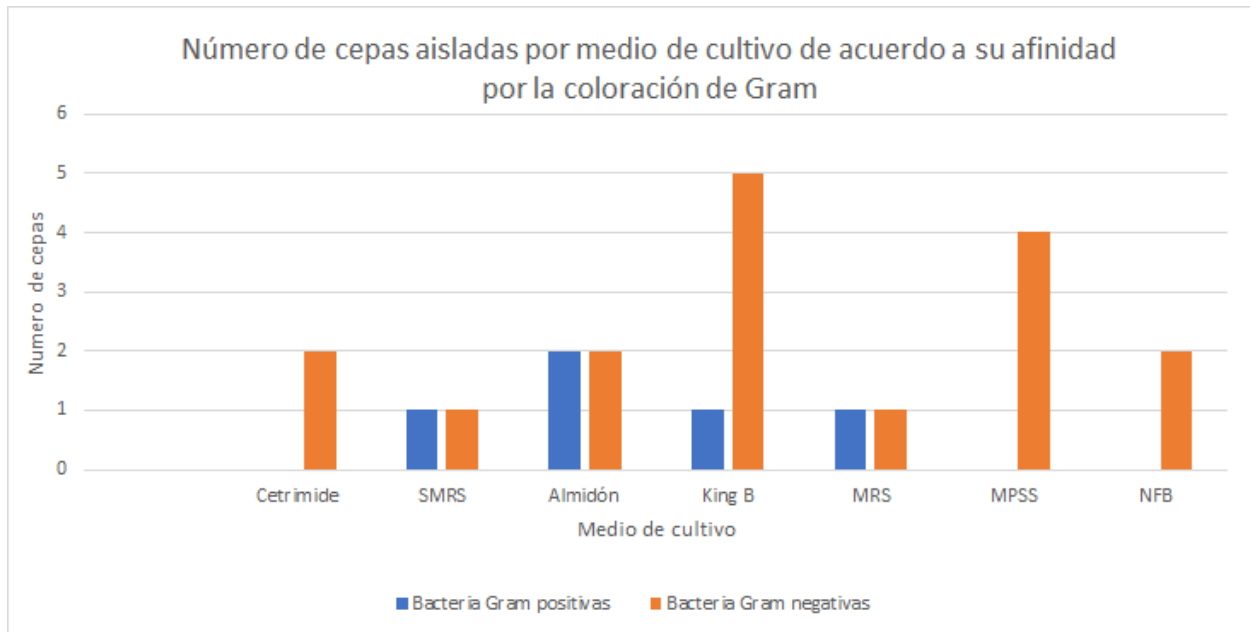


<b>RB-MP14</b>	Coco bacilos Gram negativos	-	+	Colonias puntiformes, transparentes, regulares
<b>RB-MP15</b>	Coco bacilos Gram negativos	-	+	Colonia roja, bordes irregulares, convexa
<b>RB-MP34</b>	Bacilos Gram negativos	+	+	Colonia anaranjado oscuro, bordes lisos, convexa.
<b>RB-MP24</b>	Coco bacilos Gram negativos	-	+	Colonia blanca, bordes irregulares, convexa
<b>RB-NFB102</b>	Bacilos Gram negativos	-	+	Colonias puntiformes, color café, redondas
<b>RB-NFB103</b>	Bacilos Gram negativos	-	+	Colonia puntiformes, regulares

**Tabla N°3. Caracterización morfológica y pruebas de oxidasa y catalasa de las cepas aisladas.**

\* = Morfología no bacteriana, sin clasificación según la afinidad a la coloración de Gram.

Se logró aislar el 76% de cepas gram negativas (Gráfica N° 11), en los diferentes tipos de medios de cultivos selectivos empleados. Siendo 17 cepas gram negativas de 38 aisladas (Gráfica N°10).



**Gráfica N°10** Número de cepas aisladas por cada medio de cultivo. Para los medios de cultivo: Cetrimide, SMRS, Almidón, King B, MRS, MPSS y NFB, se determinó el número de bacterias aisladas por medio de la identificación microscópica por tinción de Gram. Calderón S, López V, Peña Y, 2019



**Gráfica N°11** Porcentaje de cepas aisladas de acuerdo a la afinidad por la coloración de Gram. La identificación microscópica es por medio de la tinción de Gram. Calderón S, López V, Peña Y, 2019

#### 4.5 Antagonismo

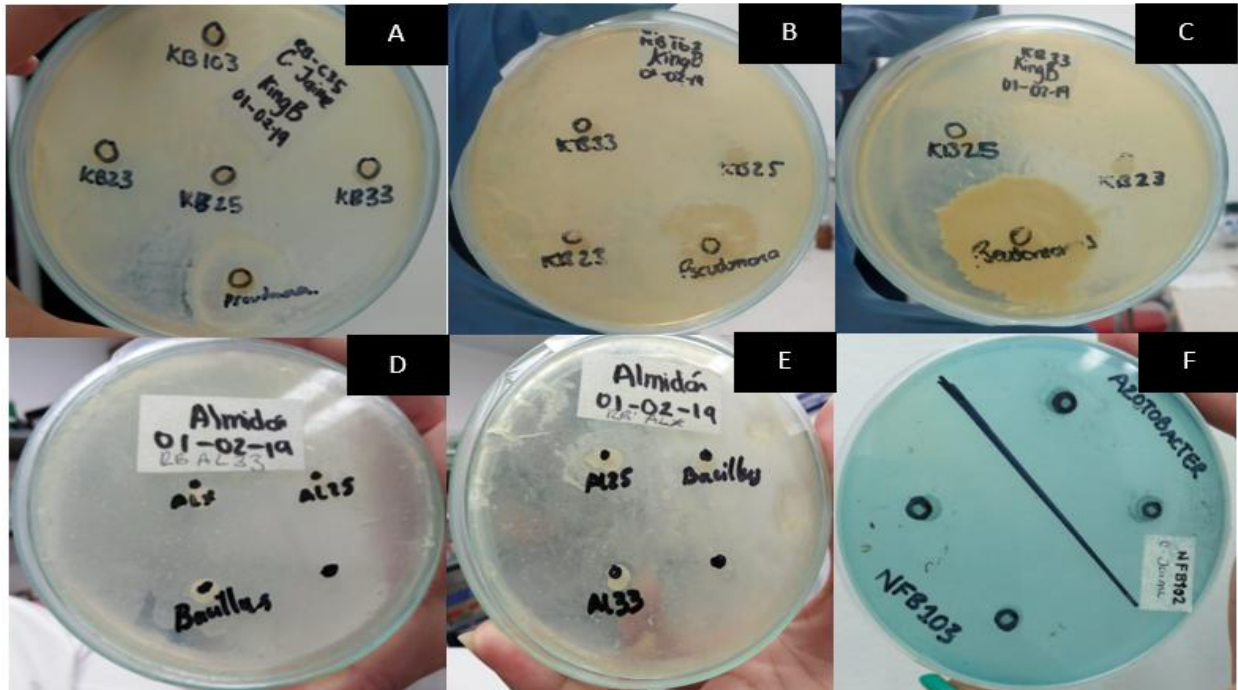
Las pruebas de antagonismo se realizaron bajo la técnica de difusión en agar modificada según Kirby Bauer<sup>66</sup> (Anexo N° 4), donde el resultado es dado en milímetros por la medición del halo generado por la bacteria contra a lo que se enfrenta, en este trabajo es frente a otra bacteria perteneciente al mismo medio de cultivo o a un control, el criterio de exclusión es la medición del halo mayor a 5 mm entre la cepa sembrada masivamente y la cepa impregnada en el disco. Teniendo en cuenta este parámetro las cepas que no cumplen son RB-KB103, RB-KB33 y RB-KB25 frente al control respectivamente (Tabla N°4).

<b>Resultados pruebas de antagonismo entre las cepas de rizobacterias</b>			
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Cepas enfrentadas</b>		<b>Resultado en mm</b>
	<b>Siembra masiva en medio</b>	<b>Inóculo en disco</b>	
King B	RB-C35	RB-KB103 RB-KB33 RB-KB25 RB-KB23 <i>Pseudomonas putida</i>	RB-C35 vs RB-KB103= 0 RB-C35 vs RB-KB33= 0 RB-C35 vs RB-KB25= 0 RB-C35 vs RB-KB23= 2 RB-C35 vs <i>Pseudomonas putida</i> = 4
King B	RB-KB103	RB-KB33 RB-KB25 RB-KB23 <i>Pseudomonas putida</i>	RB-KB103 vs RB-KB33= 0 RB-KB103 vs RB-KB25= 0 RB-KB103 vs RB-KB23= 2 RB-KB103 vs <i>Pseudomonas putida</i> = 10
King B	RB-KB33	RB-KB25 RB-KB23 <i>Pseudomonas putida</i>	RB-KB33 vs RB-KB25= 0 RB-KB33 vs RB-KB23= 2 RB-KB33 vs <i>Pseudomonas putida</i> = 20

King B	RB-KB25	RB-KB23 <i>Pseudomonas putida</i>	RB-KB25 vs RB-KB23= Crecimiento inhibido RB-KB25 vs <i>Pseudomonas putida</i> = 6
Almidón	RB-AL33	RB-ALX RB-AL25 <i>Bacillus subtilis</i>	AL33 vs ALX= 4 AL33 vs AL25= 0 AL33 vs <i>Bacillus subtilis</i> = 0
Almidón	RB-ALX	RB-AL33 RB-AL25 <i>Bacillus subtilis</i>	ALX vs AL33= 4 ALX vs AL25= 0 ALX vs <i>Bacillus subtilis</i> = 0
MPSS	RB-MP14	RB-MP34 RB-MP24 <i>Azotobacter</i>	RB-MP14 vs RB-MP34= 2 RB-MP14 vs RB-MP24= 2 RB-MP14 vs <i>Azotobacter</i> = 0
MPSS	RB-MP34	RB-MP24 <i>Azotobacter</i>	RB-MP34 vs RB-MP24= 2 RB-MP34 vs <i>Azotobacter</i> = 4
NFB	RB-NFB102	RB-NFB103 <i>Azotobacter</i>	RB-NFB102 vs RB-NFB103= 2 RB-NFB102 vs <i>Azotobacter</i> = 0

Tabla N°4. Resultados pruebas de antagonismo

Para realizar las pruebas de antagonismo se usaron los mismos agares de aislamiento selectivo (King B, Almidón y NFB) (Anexo N°4), en donde se realizaron los enfrentamientos de manera aleatoria junto con los controles empleados en producción



de AIA y amonio (Figura N°6).

**Figura N° 6. Pruebas de antagonismo en medios de cultivo entre las cepas de rizobacterias.** (A) Medio King B con cepa masiva RB-C35 contra KB-103, KB-25, KB-23, KB-33 y *Pseudomonas*. (B) Medio King B con cepa masiva KB-103 contra KB-25, KB-23, KB-33 y *Pseudomonas*.(C) Medio King B con cepa masiva KB-33 contra KB-25, KB-23 y *Pseudomonas*.(D) Medio Almidón con cepa masiva RBAL-33 contra RBALX, RBAL-25 y *Bacillus*. (E) Medio Almidón con cepa masiva RBALX contra RBAL-33, RBAL-25 y *Bacillus*.(F) Medio NFB con cepa masiva NFB102 contra NFB103 y *Azotobacter*. Calderón S, López V , Peña Y , 2019

## 5. DISCUSIÓN

Se aisló rizobacterias de suelo rizosférico, un total de 38 cepas. En general, se observó una mayor distribución en rizobacterias fijadoras de nitrógeno y con actividad enzimática amilolítica, seguido de solubilizadoras de fosfato y ácido lácticas. Estos resultados sugieren que en el suelo la distribución de microorganismos promotores de crecimiento vegetal es amplia y diversa a pesar de las condiciones de perturbación ambiental presentes en el sitio de toma de muestra.

Con respecto a la producción de fitohormonas la auxina evaluada, ácido indol 3 acético, se obtuvieron valores que oscilan desde 0,575µg/ml para el caso de RB-KB23 hasta 29,4µg/ml de RB-KB25. La producción no es tan alta como reportó Lara et al<sup>67</sup> y Flores et al<sup>68</sup>, en las rizobacterias aisladas en la Zona del Sinú Medio de Córdoba en el 2011 y en el Norte de Santander en el 2017, en donde la mayor producción de esta auxina se encontraba en 45ppm y 158,27µg/ml respectivamente; sin embargo en ninguno de estos dos estudios probaron las rizobacterias aisladas en suelo o alguna parte de la rizosfera para observar la promoción de crecimiento vegetal. Los resultados de concentración elevada de AIA se han asociado con efectos negativos en el crecimiento de plantas como en el estudio de Pacheco et al<sup>69</sup> del 2015 en donde midieron los efectos fitotóxicos o promotores de crecimiento en fracciones de AIA separadas de raíces de plántulas de lechuga, y atribuyeron este efecto a las PGPR productoras de auxinas. Sin embargo, encontraron que *Agrobacterium* sp. indujo elongación de raíces a pesar de producir niveles muy altos de AIA. Por otra parte Hernández et al<sup>70</sup> en el 2004, aislaron rizobacterias del “Cepario Nacional de Biofertilizantes de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana y de la Colección de Cultivos de la Universidad de Gent en Bélgica” en donde hubo producciones de 5.30µg/ml hasta 21.53 µg/ml de AIA, resultados similares a los realizados en el presente estudio. De igual manera en el estudio de Hoyos et al<sup>71</sup> del 2008, en donde se evaluó el efecto de la concentración hormonal de AIA y BAP por sus siglas (6-bencilaminopurina) en la generación de brotes de plátano, sus resultados óptimos de AIA fueron en promedio de 0.5mg/L los cuales promovieron de manera efectiva el crecimiento de los cultivos de plátano, mientras que

las bacterias de concentración más alta de AIA retardaron el crecimiento de este brote. Lo que sugiere que las rizobacterias evaluadas en este estudio podrían ser óptimas para la promoción vegetal de plantas nativas. Por otro lado también la asimilación del AIA de la planta es variante por cada especie y su metabolismo, lo que hace que algunas especies toleren y acepten concentraciones más altas de AIA que otras para su crecimiento. Además hubo cepas con producción de AIA y fijación de nitrógeno simultáneamente con valores cercanos al estudio de Liceta<sup>72</sup> de 36.23µg/ml, acercándose a los valores arrojados en este estudio, indicando que las cepas fijadoras de nitrógeno aisladas son útiles para la promoción de crecimiento vegetal por parte del AIA. Se sugiere inocular las rizobacterias y evaluar si estas concentraciones ayudan o no al crecimiento y establecimiento de vegetación nativa, en este caso del Parque Eco Tecnológico UAN localidad de Usme.

Cabe resaltar que todos los resultados de la producción de ácido indol 3 acético son válidos y confiables debido a la realización de la curva de calibración con un coeficiente de correlación del 91%, mostrando que los datos intersectados son confiables.

Por otro lado, de la cuantificación de amonio 34 cepas evidenciaron una producción desde 1.66 a 10.91µg/ml, siendo menores a los resultados obtenidos por Silva y Zuñiga<sup>73</sup> que estudiaron bacterias fijadoras de nitrógeno teniendo valores entre 12.52 y 37.52ppm de amonio, por lo que las cepas se deben someter a la inoculación en plantas para observar el efecto que tiene en la promoción de crecimiento vegetal.

La cepa con mayor producción fue la rizobacteria KB-23 siendo una fijadora de nitrógeno con un valor de 10.91 µg/ml, resulta un valor cercano al dado en el estudio de Romero<sup>74</sup> en el 2017 en especies de *Pseudomonas* del rizoplano y rizosfera de *Asparagus officinalis* L. sus resultados oscilaron entre 10.465 y 25.869ppm, siendo cercano al valor mínimo de ese estudio, teniendo la cepa KB-23 posibles efectos en el crecimiento de raíces y hojas de las plantas.

Por otra parte, en el estudio de Lara et al<sup>54</sup> obtuvieron valores de amonio desde 0.90 a 5.17 mg/l proveniente de suelo no cultivado adicional a un ensayo en un medio de cultivo libre de nitrógeno para verificar la actividad de las cepas estudiadas *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* concluyendo que los aislados tienen la capacidad de favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas en la zona de San Carlos, Valle del Sinú siendo la base para la creación de un biofertilizante, de igual manera, los resultados de este trabajo son relevantes como apoyo a la creación de un poli-inóculo para la restauración del suelo del bosque altoandino y los valores obtenidos son más altos que los presentados en el estudio anterior, siendo posible que den los efectos esperados en las plantas.

Sin embargo, los resultados de este estudio son superados por Aguilar y Deza<sup>75</sup> del 2014, en el que se reportó una producción de amonio de 24.74ppm en rizobacterias de *Jatropha curcas L.*, las cuales ayudaron al crecimiento del piñón blanco sin tener efectos negativos, al contrario los resultados de este trabajo no se han probado en las plantas nativas de Usme, sin embargo se espera que los resultados sean favorables para el desarrollo vegetal.

En cuanto a las pruebas de oxidasa y catalasa, 8 cepas de diferente origen dieron oxidasa negativa y catalasa positiva con una morfología microscópica perteneciente a bacilos Gram negativos, siendo probablemente enterobacterias, sin embargo, se deben realizar pruebas bioquímicas para confirmarlo. Las enterobacterias han demostrado potencial en el crecimiento de las plantas caracterizadas por la producción de amonio, índoles y solubilización de fosfato tricálcico extraídas de suelo rizosférico, se ha reportado un aumento de hasta 55.9% en las alturas de las plantas que se les han inoculado enterobacterias<sup>76</sup>.

Con respecto a la prueba de antagonismo, se observó que se produjo un efecto antagónico entre las cepas RB-KB103, RB-KB33 y RB-KB25 frente al control, este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Pangesti et al<sup>77</sup>, donde se halla un efecto antagónico entre dos cepas de *Pseudomonas* asociadas a raíz, pero se



concluyó que su utilización en un inóculo mixto, no mostraba diferencias significativas en el crecimiento de la planta *Mamestra brassicae* comparada con la inoculación realizada de con las cepas por separado.

Además de esto, el control utilizado en las pruebas de antagonismo, *Bacillus subtilis*, no mostró un efecto antagónico contra las cepas enfrentadas. Para Rojas et al <sup>78</sup>, quien ha enfrentado el género *Bacillus* con *Pseudomonas*, género que se caracteriza por producir metabolitos que son capaces de limitar el crecimiento de otros microorganismos, se encuentra que no se observa un antagonismo entre ellos, pero tampoco existe un efecto sinérgico entre estas dos cepas que pueda potenciar el crecimiento en plantas.

Los aislamientos bacterianos en la muestra de suelo tomado de la rizósfera en el Bosque alto andino, fueron principalmente bacterias Gram negativas, su presencia se puede explicar por su habilidad de adaptarse a los sustratos que encuentren, ya sean fuentes de carbono o nitrógeno<sup>79</sup>. Adicionalmente, se debe entender que la composición filogenética y funcional de los microorganismos en la rizósfera es el resultado de la interacción entre las comunidades microbianas y su interacción con la planta, con la cual cohabitan, sumado a esto el suelo de la rizósfera se enfrenta a fluctuaciones medioambientales que pueden repercutir en la composición microbiana del suelo, por esta razón resulta complejo hablar de constituyentes microbianos propios de este tipo de suelo por lo que es más provechoso estudiar los aislamientos desde su diversidad funcional.<sup>80</sup>

Los valores de producción de ácido indol acético y amonio obtenidos de las cepas aisladas de este trabajo pueden beneficiar el suelo del Bosque Alto Andino ya que al haber producción de estos metabolitos en una cantidad suficiente, pueden promover el crecimiento de especies nativas, además de ello se pueden implantar en consorcio ya que no hay antagonismo entre ellas y por lo tanto no inhibirán su efecto parcial o total de sus metabolitos, sin embargo, esto debe constatarse en ensayos con plantas de la

zona para confirmar los resultados obtenidos y realizar pruebas bioquímicas y moleculares para la selección de los microorganismos en la creación del inóculo.

Este trabajo fue expuesto y socializado en el evento “Bogotá Microbiology Meeting”, realizado el 25 y 26 de Julio de 2019, en la ciudad de Bogotá D.C. (Anexo N° 10), en la modalidad de poster (Anexo N° 11).

## 6. CONCLUSIONES

1. Se aislaron cepas nativas de una muestra de suelo del Bosque Alto Andino, con potencial efecto promotor de crecimiento vegetal.
2. Se cuantificó la producción de AIA y amonio de las rizobacterias aisladas, determinando la producción de metabolitos de crecimiento vegetal.
3. Se escogieron cepas de rizobacterias que no generan competencia entre ellas, lo que las hace excelentes candidatas para la creación de un consorcio microbiano para usarse como bioinóculo, que pueda ser usado los procesos de restauración ecológica favoreciendo el establecimiento y crecimiento de especies vegetales nativas, quienes no pueden crecer en suelos alterados y presentan bajas tasas de crecimiento que las deja en desventaja frente a especies exóticas.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ángulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sossa KE. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología* [Internet].2014[citado 26 de octubre de 2018] ;46(4):338-347.Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754114700938>
2. Perez Terron R, Gonzalez Montfort TS, Muñoz Rojas J. Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*).*Revista Iberoamericana de ciencias* [Internet].2014[citado 25 junio 2019].Disponible en:  
<http://www.reibci.org/publicados/2014/agosto/3300118.pdf>
3. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Plan Nacional de Restauración Ecológica, Rehabilitación y Recuperación de Áreas Degradadas-PNR. [Internet].Sede Bogotá. 2014 [Citado 15 abril 2018]. Disponible en:  
<http://www.minambiente.gov.co/index.php/bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistematicos/gestion-en-biodiversidad/restauracion-ecologica>
4. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. ¿Restauración Ecológica?.2014[Internet].Sede Bogotá.[Citado 15 abril 2018]. Disponible en: <http://www.humboldt.org.co/es/actualidad/item/635-restauracion-eco>
5. SER (Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group). 2004.[Internet].Tucson, Arizona.[Citado 15 abril 2018].Disponible en:  
<http://www.ser.org/resources/resources-detail-view/ser-international-primer-on-ecological-restoration>
6. Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. [Internet].Barcelona. 2004.[Citado 18 octubre 2018].Disponible en:

[http://economia.gencat.cat/web/.content/70\\_economia\\_catalana/arxius/ne-97-98\\_e\\_blanch.pdf](http://economia.gencat.cat/web/.content/70_economia_catalana/arxius/ne-97-98_e_blanch.pdf)

7. Jose A. Lucas García, Jezabel Domenech, Carmen Santamaría, María Camacho Antonio Daza Javier Gutiérrez Mañer. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and experimental Botany*. [Internet]. 2004 Dec.[Cited in october 18th of 2018]. 52(3):239-251. Available at:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847204000280>
8. Freitas SS, Aguilar Vildoso CI. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* [Internet]. 2004 [Citado em 18 outubro de 2018].28(6):987-994. Disponível em:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180214041007>
9. Castillo G, Altuna B, Michelena G, Sánchez Bravo J, Acosta M. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. In *Anales de Biología*. [Internet]. 2005[citado 25 Oct 2018].(Vol. 27: pp. 137-142) Disponible en:  
[https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2255/1/AB27%20\(2005\)%20p%20137-142.pdf](https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2255/1/AB27%20(2005)%20p%20137-142.pdf)
10. Letícia Arruda; Anelise Beneduzi; Adriana Martins; Bruno Lisboa; Cristiane Lopes; Fernanda Bertolo; Luciane Maria P. Passaglia; Luciano K. Vargas. Screening of rhizobacteria isolated from maize ( *Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology* [Internet]. 2013[Cited in october 26th of 2018]. 63 (2013): 15-22. Available at:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139312002247>

11. Éva Laslo, Éva György, Gyöngyvér Mara, Éva Tamás, Beáta Ábrahám, Szabolcs Lány. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection* [Internet]. 2012 [Cited 26 oct of 2018]. 40: pp, 43-48. Available at:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219412001226>
12. Katy Díaz Peralta, Támara Araya, Sofía Valenzuela, Katherine Sossa, Miguel Martínez, Hugo Peña Cortés, Eugenio Sanfuentes. Production of phytohormones, siderophores and population fluctuation of two root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J Microbiol Biotechnol.*[Internet]. 2012 [Cited in october 26th of 2018]. 28(5): 2003-2014. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806022>
13. Costa CD, Ferreira OD, Pasqual MC. RIZOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE PROMOTORES DO CRESCIMENTO DE PLANTAS. *Pesquisa Agropecuária Tropical* [Internet]. 2009 [Citado em 18 outubro de 2018]. 39(4):338-341. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=253020159009>
14. Sánchez López DB, Garcia Hoyos AM , Romero Perdomo FA, Bonilla Buitrago RR. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología.* [Internet]. 2014[Citado el 23 de octubre del 2018]. 16(2): 122-128. Disponible en:  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/41077/48885>
15. Sun Hwa Hong, Eun YoungLee. Vegetation restoration and prevention of coastal sand dunes erosion using ion exchange resins and the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus* sp. SH1RP8 isolated from indigenous plants. *International Biodeterioration & Biodegradation.* [Internet]. 2014[Cited 23 october of 2018]. 95 (Parte A): 262-269. Available at:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830514001747>

16. Montiel RAC, Luna BEG, García RAV. EFECTO DE LAS BACTERIAS DE SUELO DE BOSQUE BENÉFICAS PARA PLANTAS. JÓVENES EN LA CIENCIA. [Internet]. 2017[citado 23 Oct 2018] ;3(2) :943-947. Disponible en : <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/2191>
17. González P, Sossa K, Rodríguez F , Sanfuentes E . Rhizobacteria strains as promoters of rooting in hybrids of *Eucalyptus nitens* × *Eucalyptus globulus*. Chilean journal of agricultural research. [Internet]. 2018[cited 23 Oct 2018]; 78(1): 3-12. Available at: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-58392018000100003&script=sci\\_arttext&lng=pt](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-58392018000100003&script=sci_arttext&lng=pt)
18. Uniyal N, Chauhan A, Sharma K , Mitra D. Plant growth promotion by bacterial inoculum with different conditions and estimation of enzyme activity from germinating seeds and bacterial isolates. Current Trends in Biotechnology & Pharmacy [Internet]. 2018[citado 24 Oct 2018 ]; 12(1). Available at: <http://abap.co.in/sites/default/files/Paper%20-%206NEW.pdf>
19. Aviles Garcia ME, Flores Cortez I, Hernández Soberano C, Santoyo G, Valencia Cantero E. La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. Revista argentina de microbiología. [Internet]. 2017[citado 24 Oct 2018] 48(4): 342-346. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v48n4/v48n4a15.pdf>
20. Montenegro A L, Vargas Ríos O. Caracterización de bordes de bosque altoandino e implicaciones para la restauración ecológica en la Reserva Forestal de Cogua (Colombia). Rev. biol. trop [Internet]. 2008[citado 25 Octubre del 2018] ; 56( 3 ): 1543-1556. Disponible en : [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442008000300043&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442008000300043&lng=en).

21. Vargas, O. Guía metodológica para la restauración ecológica del bosque altoandino. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.[Internet]. 2007[citado 15 Oct 2018]. Disponible en: <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2016/06/guia-metodologica-restauracion-ecologica.pdf>
22. Lara Mantilla Cecilia, Negrete Peñata Jorge Luis. Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichanthium aristatum*). Rev. colomb. biotecnol [Internet]. 2015[citado 2018 Oct 29] ; 17( 1 ): 122-130. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752015000100015&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752015000100015&lng=es).
23. A. Grobelak; A. Napora; M. Kacprzak. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. Ecological Engineering. [Internet]. 2015[Cited in october 29th of 2018]. 84 (2015): 22-28. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857415301257>
24. Santiago TR, Grabowski C, Rossato M, Romeiro R S, Mizubuti, ES. Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. Biological Control. [Internet]. 2015[citado 29 Oct 2018]; 80: 14-22. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964414001832>
25. Rekha, PD; Lai, Wai-An; Arun, AB; Joven, Chiu-Chung. Efecto de *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 libre y encapsulada y *Bacillus subtilis* CC-pg104 sobre el crecimiento de plantas en condiciones gnotobióticas. Tecnología Bioresource [internet]. 2006[citado 29 Oct 2018].98 (2007): 447-451. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406000356>
26. Yanhui He; Zhansheng Wu; Bang-Ce Ye; Jun Wang; Xinyuan Guan; Jinghao Zhang. Viability evaluation of alginate-encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 under simulated salt-stress conditions and its effect on cotton growth



.European Journal of Soil Biology.[Internet]. 2016[Cited 29 Oct 2018] ;75: 135-141. Available at:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1164556316300590>

27. De Gregorio PR, Michavila G, Ricciardi Muller L, de Souza Borges C, Pomares MF, Saccol de Sá EL, et al. Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants. PLoS ONE [internet]. 2017[Cited in october 29th of 2018]. 12(5) . Available at:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0176930>

28. Barrera Cataño JI, Valdes Lopez C. Herramientas para abordar la restauración ecológica de áreas disturbadas en Colombia. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.[Internet]. 2007[citado 13 Febrero 2019].Disponible en:  
<https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4887>

29. Vargas , O. Restauración ecológica: biodiversidad y conservación. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2011[citado 13 Febrero 2019].Disponible en:  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/19280/28009>

30. Lowell A, Aronson J, Winterhalder K. Principios de SER International sobre la restauración ecológica [Internet]. [citado 21 abril 2019]. Disponible en:  
[https://cdn.ymaws.com/www.ser.org/resource/resmgr/custompages/publications/SER\\_Primer/ser-primer-spanish.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.ser.org/resource/resmgr/custompages/publications/SER_Primer/ser-primer-spanish.pdf)

31. Bacca PP, Burbano DL. Restauración ecológica de disturbios antrópicos presentes en la zona alto andina. Revista de Ciencias Agrícolas[Internet].2018; 35(2):36-50[citado 21 Abril 2019].Disponible en:  
<http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/4273>

32. Vargas, O. Restauración ecológica del bosque altoandino: Estudios diagnósticos y experimentales en los alrededores del embalse de Chisacá (Localidad de Usme,

Bogotá DC). Grupo de Restauración Ecológica. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia [Internet].2007[citado 21 Abril 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/259482690\\_Restauracion\\_ecologica\\_del\\_bosque\\_altoandino\\_estudios\\_diagnosticos\\_y\\_experimentales\\_en\\_los\\_alrededores\\_del\\_Embalse\\_de\\_Chisaca\\_Localidad\\_de\\_Usme\\_Bogota\\_DC](https://www.researchgate.net/publication/259482690_Restauracion_ecologica_del_bosque_altoandino_estudios_diagnosticos_y_experimentales_en_los_alrededores_del_Embalse_de_Chisaca_Localidad_de_Usme_Bogota_DC)

33.Benjumbeda D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. [Trabajo de grado en farmacia]. Sevilla: Universidad de Sevilla;2017.

34.Gounda S, Kerry R, Dass G, Paramithiotis S, Shin, H, Patra J. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. India: Department of Biotechnology. [Internet].2017[citado 21 Abril 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317303415>

35. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M, Touraine B, Moëne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Francia: Centre National de la Recherche Scientifique [Internet].2013[citado 21 Abril 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775148/>

36. Molina D, Bustillos M, Rodriguez O, Morales Y, Saenz Y, Castañeda M, Muñoz J. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. México: Grupo Ecología y Supervivencia de Microorganismos[Internet].2015[citado 21 Abril 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/293086504\\_Mecanismos\\_de\\_fitoestimulacion\\_por\\_rizobacterias\\_aislamientos\\_en\\_America\\_y\\_potencial\\_biotecnologico](https://www.researchgate.net/publication/293086504_Mecanismos_de_fitoestimulacion_por_rizobacterias_aislamientos_en_America_y_potencial_biotecnologico)

37.Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. India: Journal of King Saud University – Science.

[Internet]2013[citado 21 Abril 2019]. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364713000293>

38.Venjan V, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrullohaq A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. Malaya: Institute of Biological Sciences, Faculty of Science.2016[citado 21 Abril 2019]. Disponible en:  
<https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/573>

39.Hanna poffenbarger, H.P. Nitrogen in Soils/Cycle. In: Scott elias, S.E (ed.) Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Lexington, KY, United States: ; 2018. p. 13-21[citado 21 Abril 2019].Available at:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095489114708>

40. Doler, D., Doyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Voss, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences [Internet]2013;368(1621)[citado 21 Abril 2019]. Available at:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3682748/>

41. Mahendra prasad, M.P. Chapter Seven - Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges. In: Lokesh kumar, L.K (ed.) PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. : Elsevier BV; 2019. p. 129-157[citado 21 Abril 2019].

42.Restrepo Franco GM , Marulanda Moreno S , de la Fe Pérez Y, Díaz de la Osa A, Lucía Baldani V, Hernández Rodríguez A.Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Revista Cenic Ciencias Biológicas [Internet]. 2015; 46(1), 63-76.[citado 21 Abril 2019]. Disponible en:  
<https://revista.cnice.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-solubilizadoras-de-fosfato-y-sus-potencialidades-de-uso-en-la-promoci%C3%B3n-del>

43. Paredes Mendoza M, Espinosa Victoria D. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* [Internet]. 2010;28(1), 61-70[citado 21 Abril 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792010000100007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792010000100007&lng=es&tlng=es).

44. Cerón Rincón LE, Aristizábal Gutiérrez FA. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología* [Internet]. 2012;XIV(1):285-295[citado 26 Abril 2019]Disponible en : <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081026>

45. Noel Echeverría R. ESTUDIOS DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO (PGPR) COMO ALTERNATIVA DE APLICACIÓN A SUELOS CON LIMITANTES ABIÓTICAS. [Tesina en licenciatura de química]. Santa Rosa (La Pampa): Universidad Nacional de la Pampa:2011.

46. Hernández A, Rives N, Caballero A, Hernández A, Heydrich M. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista colombiana de biotecnología* [Internet].2004;6(1): 6-13[citado 1 mayo 2019]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/536/1031>

47. Moreno Resendez A, Garcia Mendoza V, Reyes Carrillo JL, Vasquez Arroyo J, Cano Rios P. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista colombiana de biotecnología* [Internet].2018; XX(1):68-83 [citado 1 Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v20n1/0123-3475-biote-20-01-68.pdf>

48. Rangel Sanchez G, Castro Mercado E, Beltran Peña E, Reyes de la Cruz H, Garcia Pineda E. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos

en plantas. Revista de la DES Cianecias Biologico Agropecuarias [Internet].2010; 12(2):90-95 [citado 1 Mayo 2019]. Disponible en:  
<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Elacidosalic%C3%ADlicoyresistenci aenplantas.pdf>

49. Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodriguez F, Sossa KE. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de microbiología [Internet].2014; 46(4):338-347 [citado 1 Mayo 2019]. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754114700938>

50. Fahad S, Hussain S, Matloob A, Ahmed F, Khaliq A. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. China: College of Plant Science and Technology[Internet] 2014[citado 11 Abril 2019].Disponible en:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3754-2>

51. Fahad S, Hussain S, Matloob A, Ahmed F, Khaliq A. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. China: College of Plant Science and Technology[Internet] 2014[citado 11 Abril 2019].Disponible en:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10725-014-0013-y>

52. Vega P, Canchignia H, González M, Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Cuba: Universidad de La Habana e Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical[Internet] 2016[citado 18 Abril 2019].Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-5936201600050005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-5936201600050005)

53. Castillo G, Altuna B, Michelena G, Sánchez J, Acosta M. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. Anales de Biología [Internet]. 2005[citado 11 Septiembre 2019) 27: 137-142.

Disponible en: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/27/PDF/16-CUANTIFICACION.pdf>

54. Lara C, Villalba M, Oviedo Luis. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba. Colombia: Universidad de Córdoba. [Internet] 2007 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/13239/1/711-4751-1-PB.pdf>

55. Beneduzi Anelise, Ambrosini Adriana, Passaglia Luciana M.P.. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet. Mol. Biol. [Internet]. 2012 [cited 2019 Mar 20]; 35( 4 Suppl 1 ): 1044-1051. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572012000600020&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572012000600020&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>.

56. Contreras Roa B, Lopez Perez S, Reyes Vallejo JP, Cardenas Caro DM. Producción de un inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Dialnet, 16(2), 20-29 [Internet] 2011 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5364556>

57. Types Of Fermentation- Submerged, Solid And Surface Typee-Krishi Shiksha [Internet]. 2012 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/page/view.php?id=5150>

58. Subramaniam R, Vimala R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. Society for science and nature, 3(3), 480-486 [Internet] 2012 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/232041875\\_Solid\\_state\\_and\\_submerged\\_fermentation\\_for\\_the\\_production\\_of\\_bioactive\\_substances\\_a\\_comparative\\_study](https://www.researchgate.net/publication/232041875_Solid_state_and_submerged_fermentation_for_the_production_of_bioactive_substances_a_comparative_study)

59. Servidor educativo Departamento de microbiología y genética. [Internet]. Salamanca; [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/ampliacion3/fermentador.htm>

60. Escobar L, Ríos D, Gómez, M. Colección de cepas microbianas usadas en formación y proyectos de investigación aplicada en el centro para la formación cafetera SENA Bogotá: Regional Caldas. Revista Nova, 2(1), 8-15 [Internet] 2016 [citado 13 diciembre 2018]. Disponible en: <http://revistas.sena.edu.co/index.php/rnova/article/view/615/679>

61. Ortiz T, Ocampo V, Prada L, Franco M. Métodos de conservación para actino Bacterias con actividad solubilizadora de fósforo. Colombia: Revista Colombiana de Biotecnología, 18(2), 32-39 [Internet] 2015 [citado 13 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n2/v18n2a05.pdf>

62. Gomez Avendaño G, Gonzalez Perez D, Hernandez Vega J. Evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno de rizobacterias nativas de bosque Altoandino de Usme para uso en restauración ecológica. [Tesis de grado de bacteriología y laboratorio clínico]. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2017.

63. Fernández Olmos A, García de la Fuente C, Sáez Nieto JA, Valdezate Ramos S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [Internet]. 2010 [citado 2 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

64. Sánchez Leal LC, Corrales Ramirez LC. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Revista Nova [Internet]. 2005; 3(4) [citado 2 Mayo 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/316949251\\_Evaluacion\\_de\\_la\\_congelacion\\_para\\_conservacion\\_de\\_especies\\_autoctonas\\_bacterianas](https://www.researchgate.net/publication/316949251_Evaluacion_de_la_congelacion_para_conservacion_de_especies_autoctonas_bacterianas)

65. Sánchez L, Macías C. Efecto de la resiembra continúa en las características bioquímicas de una colección bacteriana. México: Jóvenes en la ciencia, 1(2), 484-488[Internet] 2016 [citado 14 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/16/pdf1>

66. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology [Internet]. 2009 [citado 2 Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.asmscience.org/docserver/fulltext/education/protocol/protocol.3189.pdf?expires=1556857602&id=id&acname=guest&checksum=433313FCA3C7A948836B7C72EE39A051>

67. Lara C, Oviedo L, Aleman A. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial [Internet]. 2011; 9(1): 17-23[citado 21 Julio 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n1/v9n1a03.pdf>

68. Florez Marquez JD, Leal Medina GI, Ardila Leal LD, Cardenas Caro DM. Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Norte de Santander (Colombia). Agrociencia [Internet]. 2017; 51: 373-391[citado 21 Julio 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n4/1405-3195-agro-51-04-00373.pdf>

69. Pacheco H, Rodríguez A, González R, Amora E, Guerrero J, Rodríguez A., Evaluación del efecto fitotóxico de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta* (Moench) Lab. Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, DF. [Internet]. 2015; 6(1): 6-13[citado 28 noviembre 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682015000200009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682015000200009)



70. Hernández A, Rives N, Caballero A, Hernández AN, Heydrich M. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología* [Internet].2004; 6(1): 6-13[citado 21 Julio 2019]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/536>
71. Hoyos JL, Perea Roman C, Velasco RJ. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la micropropagación del plátano dominico harton ( *Musa AAB Simmonds*). [Internet].2008 ;6(2), 99-104[citado 27 Noviembre 2019]. Disponible en:<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v6n2/v6n2a13.pdf>
72. Liceta Llanco M. Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas* y *Bacillus* provenientes de las rizosfera de diferentes variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su uso como potenciales promotoras del crecimiento vegetal [Tesis en biología]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina;2015.
73. Silva Vilcabanca LB , Zuñiga Valdera GE. Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L. y su efecto en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” [Tesis en biología- microbiología - parasitología].Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo;2017.
74. Romero Terrones KO. Especies de *Pseudomonas* aisladas de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas [Tesis en biología- microbiología - parasitología].Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo;2017
75. Aguilar Villalobos SN, Deza Zapata CL. Efecto de rizobacterias nativas promotoras del crecimiento de plantas en la emergencia y supervivencia de *Jatropha curcas* L., piñón blanco, en Lambayeque [Tesis en biología- microbiología - parasitología].Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo;2014

76. Cornetero Bonilla JV, Segura Caro JJ. Enterobacterias aisladas de rizoplasma y rizósfera y su potencial como promotoras de crecimiento de *Asparagus officinalis* L. [Tesis en biología- microbiología - parasitología].Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo;2017

77. Nurmi Pangesti, Simon Vandenbrande, Ana Pineda, Marcel Dicke, Jos M. Raaijmakers, Joop J.A. Van Loon, Antagonism between two root-associated beneficial *Pseudomonas* strains does not affect plant growth promotion and induced resistance against a leaf-chewing herbivore, *FEMS Microbiology Ecology*.2017;93, 4. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix038>

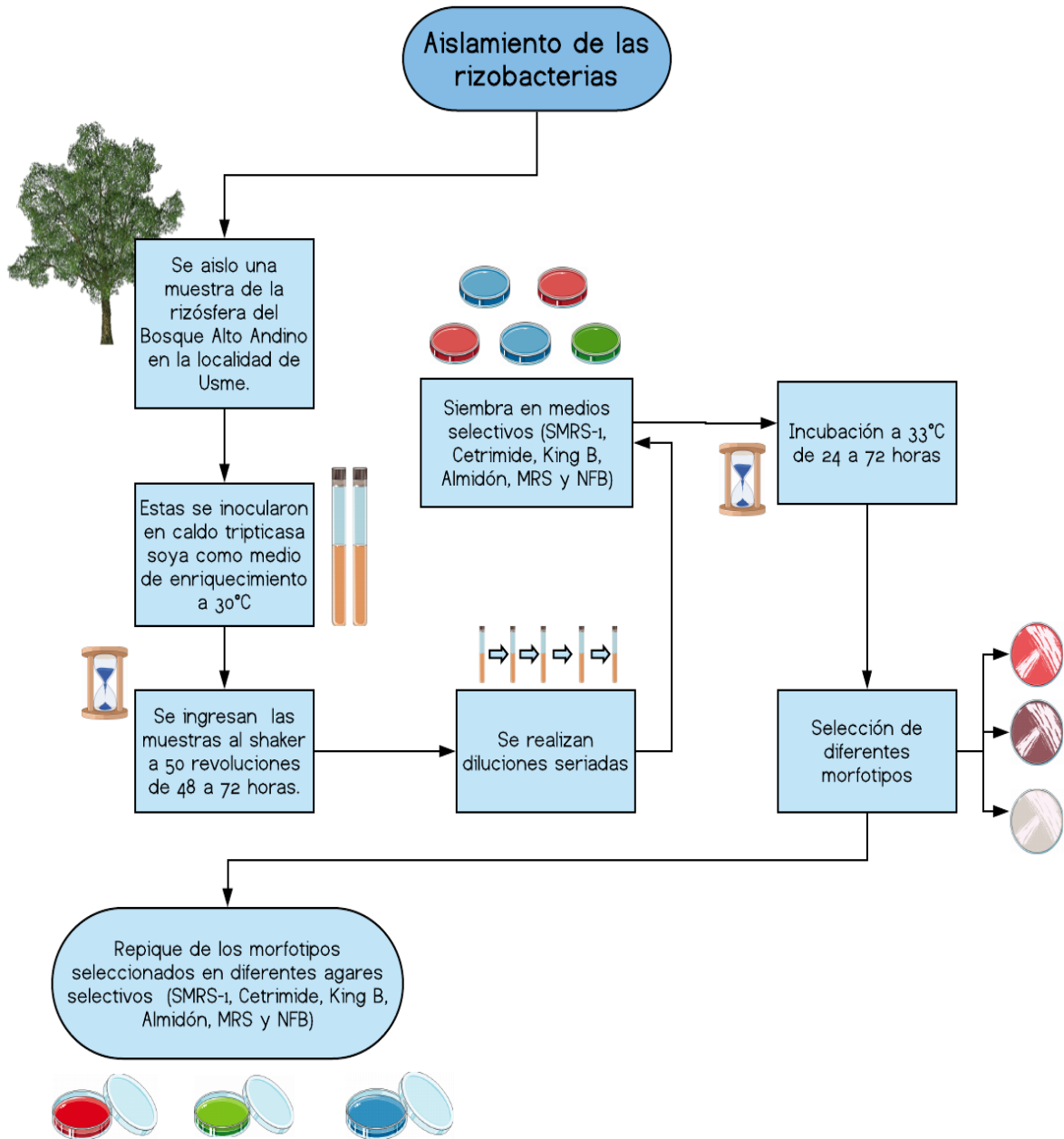
78.Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C. E., & Santoyo, G. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*.2016; 22(1), 45-57.[Citado el 21 julio del 2019] Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2016000100045](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2016000100045)

79.Calvo Velez P, Reymundo meneses L, Zuñiga Davila D. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa ( *Solanum tuberosum*) en zonas Altoandinas. *Ecología aplicada* [Internet]. 2008;7:1,2 [citado 11 Noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v7n1-2/a17v7n1-2.pdf>

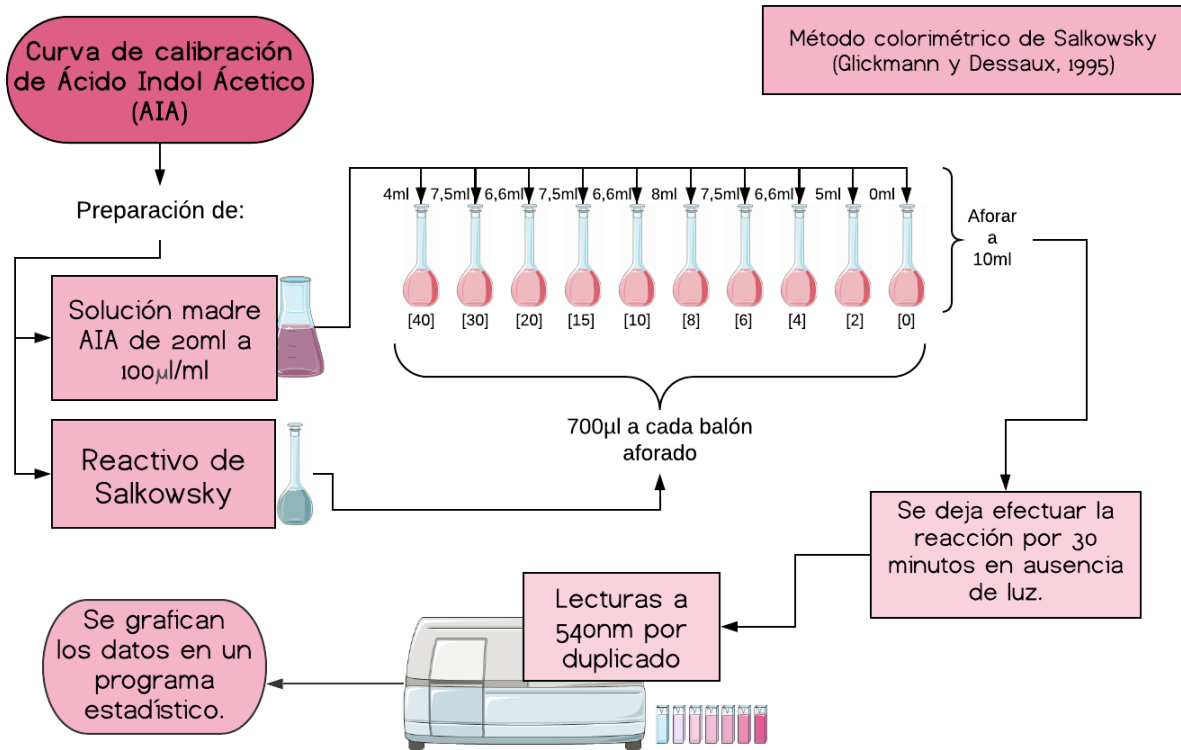
80. Christine V. Hawkes, Kristen M. DeAngelis, and Mary K. Firestone. The rhizosphere. An ecological perspective. [Internet]. United States. Academic Press. 2007.[Cited on November 11 2019]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120887750500033>

## 8. ANEXOS

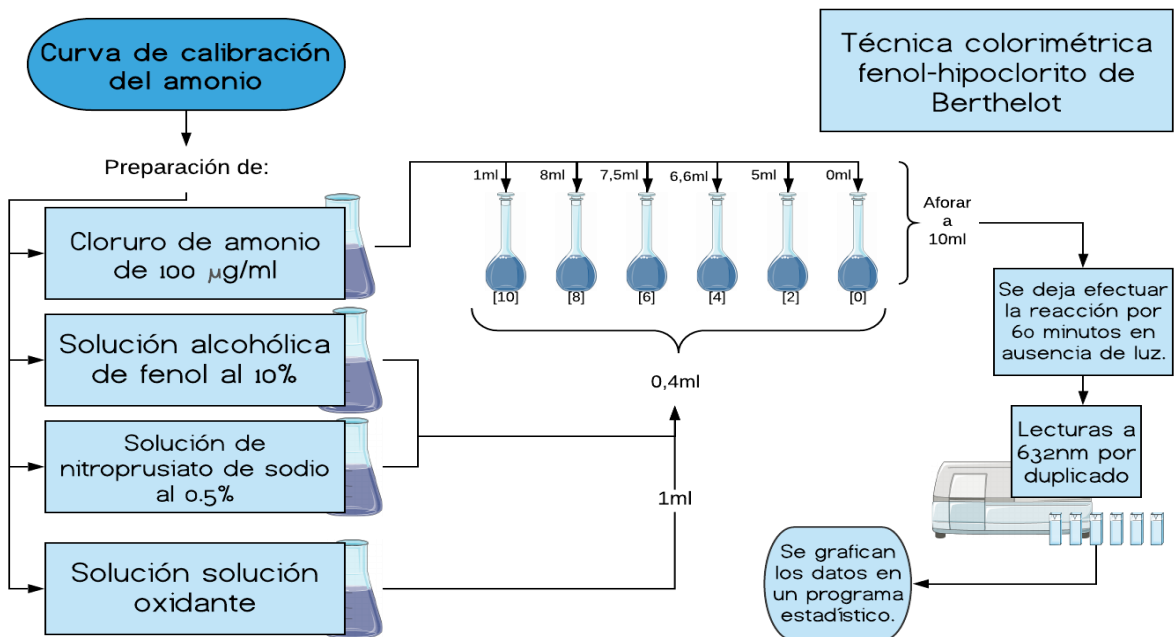
### Anexo N°1. Aislamiento de rizobacterias.



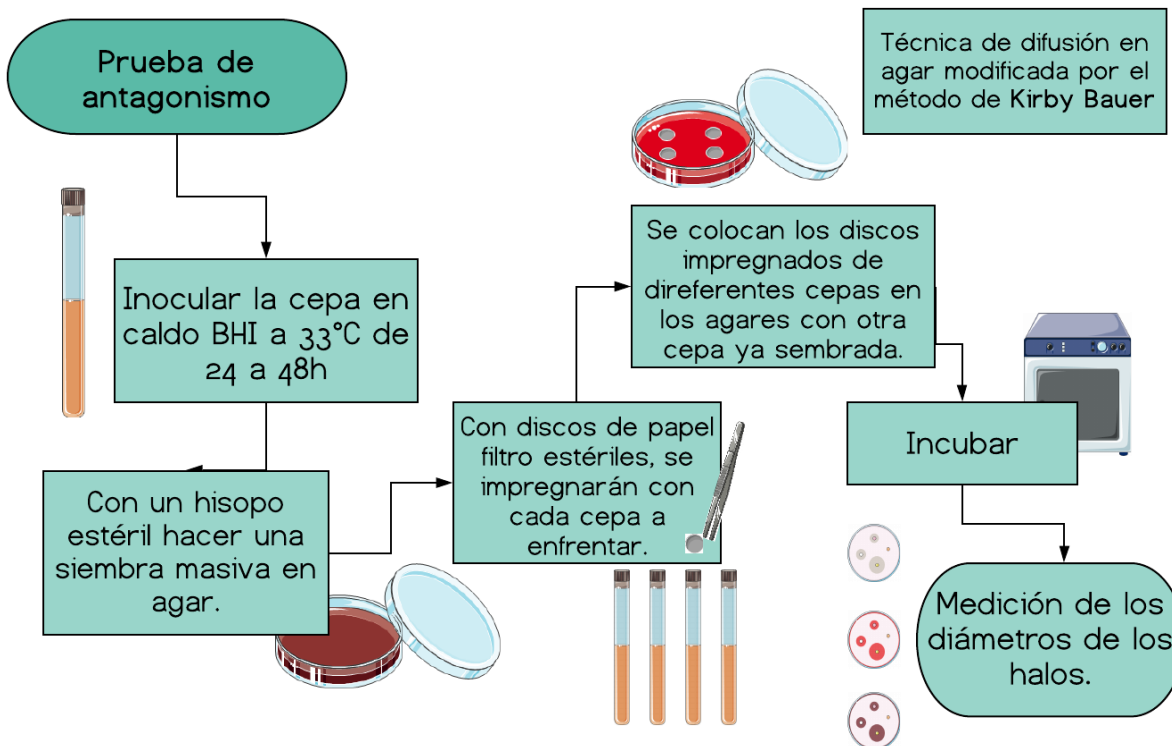
## Anexo N°2. Curva de Calibración de Ácido Indol Acético.



## Anexo N°3. Curva de Calibración del Amonio.



**Anexo N°4. Prueba de antagonismo.**



**Anexo N° 5. Tabla de mediciones por triplicado de la curva de calibración de AIA.**

Concentración AIA ug/ml	Media de absorbancias
0	0.000
2	0.026
4	0.103
6	0.246
8	0.437
10	0.636
15	0.720
20	0.909
30	0.918

40	1.403
----	-------

**Anexo N°6. Tabla de mediciones por triplicado de la curva de calibración de amonio.**

Concentraciones	Absorbancia por triplicado	Media de absorbancia
10	0,582-0,582-0,582	0.582
8	0,570-0,570-0,572	0.57
6	0,389-0,3890,387	0.388
4	0,260-0,259-0,259	0.259
2	0,082-0,082-0,083	0.082
0	0,000-0,000-0,000	0

**Anexo N° 7. Concentración de ácido indol acético en las rizobacterias aisladas.**

Concentración de ácido indol acético en µg/ml			
Código de la cepa	Concentración AIA µg/ml	Código de la cepa	Concentración AIA µg/ml
RB-RB5	0	RB-AL25	0,92920354
RB-RB15	0	RB-KB103	5,324483776
RB-RB24,2	3,790560472	RB-KB33	22,49162537
R7B-RB304	0	RB-KB25	29,45427729
RB-RB24	4,94100295	RB-KB23	0,575221239
RB-RB32	5,353982301	RB-KB13	0
RB-RB103	0	RB-KB304	0
RB-RB43	2,640117994	RB-MRS14	0
RB-C23	0	RB-MRS13	1,696165192

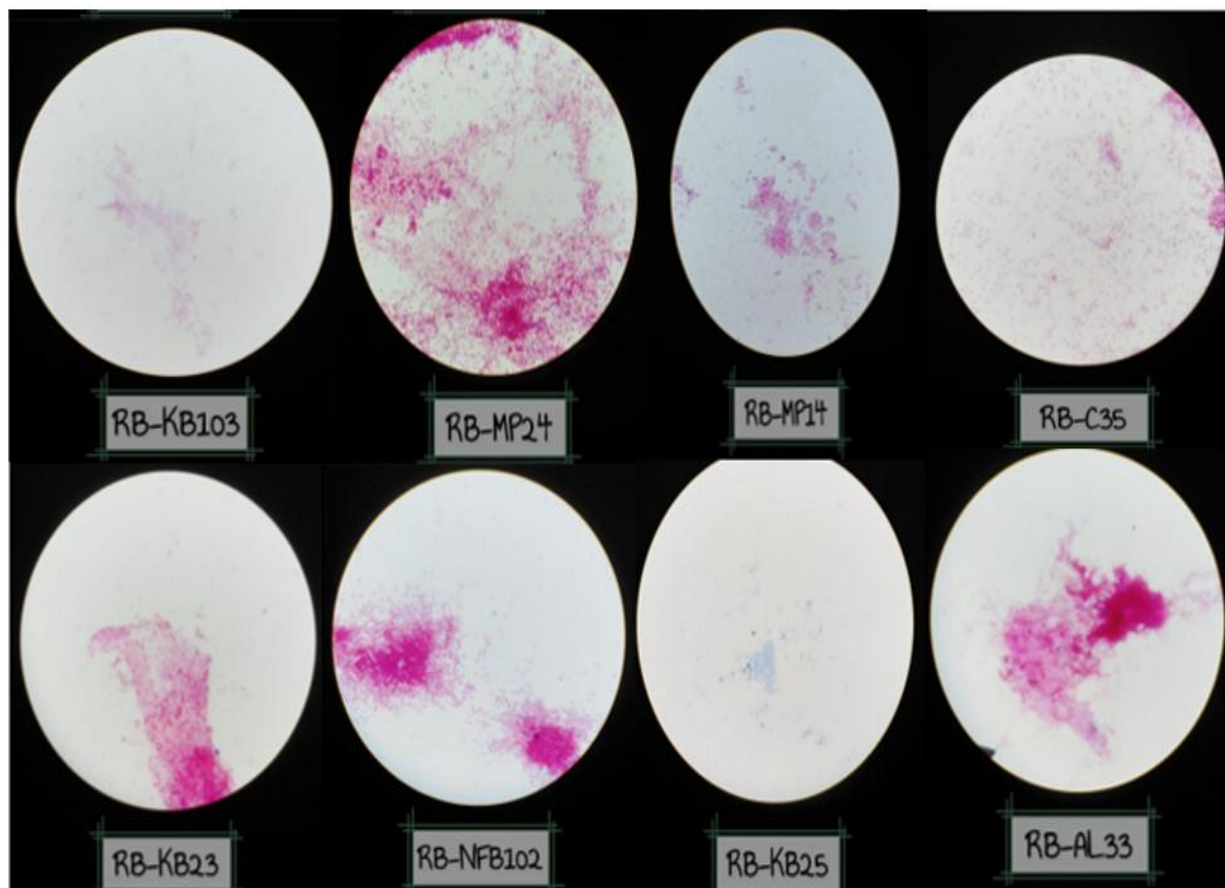
RB-C35	0	RB-MRS2	0
RB-C25	0	RB-MRS24	0
RB-SM13	0	RB-MP14	1,288135841
RB-SM34	0	RB-MP15	0
RB-SM23	0	RB-MP34	1,814159292
RB-SM-1	2,787610619	RB-MP24	1,781710914
HG-01	0	RB-NFB102	0
RB-AL24	0	RB-NFB103	1,843657817
RB-AL33	9,542772861	RB-ALX	0
RB-AL13	0	<i>Bacillus subtilis</i>	4,35132448
RB-AL23	0	<i>Pseudomonas putida</i>	4,675516224

**Anexo N° 8. Concentración de ácido amonio en las rizobacterias aisladas.**

<b>Concentración de amonio en µg/ml</b>			
<b>Código de la cepa</b>	<b>Concentración amonio µg/ml</b>	<b>Código de la cepa</b>	<b>Concentración amonio µg/ml</b>
RB-RB5	0	RB-AL25	6,374805599
RB-RB15	4,041990669	RB-KB23	10,91601866
RB-RB24,2	2,844479005	RB-KB103	2,720062208
RB-RB304	2,548989114	RB-KB33	3,279937792
RB-RB24	3,777604977	RB-KB25	3,886469673
RB-RB32	0	RB-KB13	0
RB-RB103	2,580093313	RB-KB304	0
RB-RB43	3,171073095	RB-MRS14	3,8788677
RB-C23	2,9844479	RB-MRS13	4,987676544
RB-C35	6,981337481	RB-MRS2	3,9087654
RB-C25	3,8765678	RB-MRS24	4,244167963

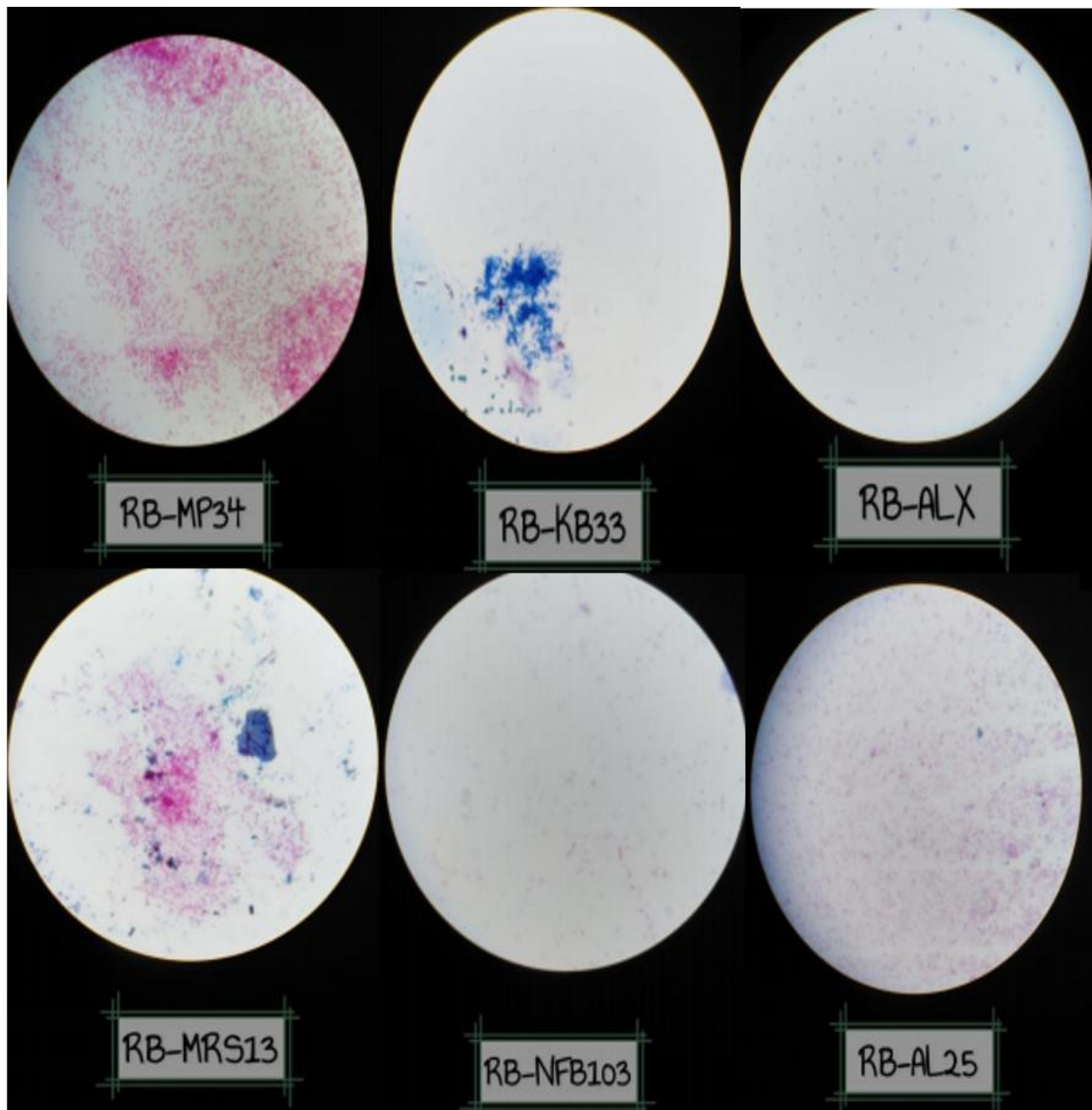
RB-SM13	2,987656	RB-MP14	5,643856921
RB-SM34	3,987765	RB-MP15	5,846034215
RB-SM23	1,66251944	RB-MP34	3,404354588
RB-SM-1	6,592534992	RB-MP24	3,987675899
HG-01	0	RB-NFB102	6,981337481
RB-AL24	3,9876756	RB-NFB103	3,777604977
RB-AL33	2,786757489	RB-ALX	4,477449456
RB-AL13	3,9876859	<i>Bacillus subtilis</i>	1,094712286
RB-AL23	5,690513219	<i>Azotobacter</i>	8,209953344

**Anexo N° 9. Gram de rizobacterias.**





**Descripción:** RB-KB103: Bacilos Gram negativos, RB-MP24: Coco bacilos Gram negativos, RB-MP14: Coco bacilos Gram negativos, RB-C35: Bacilos Gram negativos, RB-KB23: Bacilos Gram negativos, RB-NFB 102: Bacilos Gram negativos, RB-KB25: Bacilos Gram negativos, RB-AL 33: Bacilos Gram negativos.



**Descripción:**RB-MP34: Bacilos Gram negativos, RB-KB33: Coco bacilos Gram negativos, RB-ALX: Bacilos Gram positivos, RB-MRS13: Cocos bacilos Gram negativos, RB-NFB103: Bacilos Gram negativos, RB-AL25: Bacilos Gram positivos.

**Anexo N°10. Certificado V Bogotá Microbial Meeting Bomm**

**Descripción:**RB-MP34: Bacilos Gram negativos, RB-KB33: Coco bacilos Gram negativos, RB-ALX: Bacilos Gram positivos, RB-MRS13: Cocos bacilos Gram negativos, RB-NFB103: Bacilos Gram negativos, RB-AL25: Bacilos Gram positivos.

**Anexo N°10. Certificado V Bogotá Microbial Meeting Bomm**

