



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE  
RIZOBACTERIAS NATIVAS DE BOSQUE ALTOANDINO DE USME PARA  
USO EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTA, D.C. MAYO 31 DE 2018



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE  
RIZOBACTERIAS NATIVAS DE BOSQUE ALTOANDINO DE USME PARA  
USO EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA

ESTUDIANTES:

GABRIELA GÓMEZ AVENDAÑO  
DIEGO FERNANDO GONZÁLEZ PÉREZ  
JOHANA CRISTINA HERNÁNDEZ VEGA

ASESORA EXTERNA

CAROLINA JAIME RODRIGUEZ  
M.Sc EN GESTIÓN AMBIENTAL

ASESORA INTERNA

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN  
M.Sc, Ph.D EN BIOCENCIAS

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTA, D.C. MAYO 31 DE 2018

## DEDICATORIA

A nuestras familias, quienes son el motivo para no desfallecer y seguir nuestro camino superando cada adversidad, quienes fueron testigos de todo nuestro proceso y estuvieron presentes brindándonos su apoyo tanto emocional como económico.

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por darnos la fortaleza y paciencia para culminar este trabajo.
- A nuestras familias, por el apoyo incondicional durante toda la carrera.
- A la profesora Carolina Jaime, por brindarnos la confianza para llevar a cabo este trabajo.
- A la Universidad Antonio Nariño y al Tecnoparque SENA Nodo Bogotá, por facilitarnos los recursos necesarios para la ejecución del trabajo.
- A nuestra Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por brindarnos las bases académicas.
- A la profesora Judith Camacho Kurmen, por su dedicación y asesoría en el desarrollo del trabajo.
- Al profesor de la Universidad Antonio Nariño Camilo de los Ángeles Cárdenas, por su colaboración en el análisis estadístico.

## CONTENIDO

	PÁG.
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
LISTA DE ANEXOS	11
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GENERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. ANTECEDENTES	16
4. MARCO TEÓRICO	25
4.1 EL BOSQUE ALTOANDINO COLOMBIANO	25
4.2 ÁRBOLES NATIVOS DE BOSQUE ALTOANDINO EMPLEADOS EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA	26
4.2.1 <i>Vallea stipularis</i>	27
4.2.2 <i>Escallonia paniculata</i>	28
4.3 RESTAURACIÓN ECOLÓGICA	29
4.3.1 Restauración pasiva y activa	30
4.3.2 Disturbio	30
4.3.3 Proceso de restauración ecológica	31
4.3.4 Empleo de bacterias en restauración ecológica	31
4.4 BACTERIAS EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL	32
4.4.1 Mecanismos directos	32
4.4.2 Mecanismos indirectos	33
4.5 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO	34
4.5.1 Importancia del nitrógeno	34
4.5.2 Ciclo del nitrógeno	34
4.5.3 Mineralización	36
4.5.4 Absorción	36
4.5.5 Desnitrificación	36
4.6 FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO	37
4.6.1 Proceso bioquímico en la fijación biológica	

de nitrógeno	37
4.6.2 Estrategias de protección frente al oxígeno	38
4.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)	38
4.7.1 Cuantificación de nitrógeno <i>in vitro</i>	38
4.7.2 Cuantificación de ácido indol acético (AIA)	39
4.8 MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO	41
4.8.1 Microorganismos de vida libre	41
4.8.2 Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno	42
4.9 BIOINÓCULOS	42
<b>5. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>45</b>
5.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	45
5.2 UNIVERSO, POBLACIÓN, MUESTRA	45
5.2.1 Universo	45
5.2.2 Población	45
5.2.3 Muestra	45
5.3 HIPÓTESIS, VARIABLE, INDICADORES	45
5.4 FASE I. DETERMINACIÓN DE RIZOBACTERIAS CON CAPACIDAD FIJADORAS DE NITRÓGENO	46
5.4.1 Recolección de muestras y preparación	46
5.4.2 Aislamiento en medios selectivos para rizobacterias Fijadoras de nitrógeno	47
5.5 FASE II. SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS CON MAYOR POTENCIAL FIJADOR DE NITRÓGENO <i>IN VITRO</i>	48
5.5.1 Cuantificación de ácido indol acético (AIA)	48
5.5.2 Cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i>	49
5.5.3 Identificación presuntiva de rizobacterias fijadoras de nitrógeno	50
5.6 FASE III. ESTABLECIMIENTO DEL APORTE DE LAS BACTERIAS AL CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES VEGETALES	51
5.6.1 Preparación de bioinóculos	51

5.6.2	Ensayos de crecimiento vegetal	51
5.6.3	Análisis estadístico	53
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>54</b>
6.1	AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS PARA RIZOBACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO	54
6.2	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)	65
6.3	CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO FIJADO <i>IN VITRO</i> (PRODUCCIÓN DE IÓN AMONIO)	67
6.4	PREPARACIÓN DE BIONÓCULOS	68
6.5	IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE RIZOBACTERIA FIJADORAS DE NITRÓGENO	70
6.6	ENSAYOS DE CRECIMIENTO VEGETAL	70
6.6.1	Altura, número de hojas y grosor de <i>Escallonia paniculata</i>	73
6.6.2	Altura, número de hojas y grosor de <i>Vallea stipularis</i>	75
6.6.3	Monitoreo cualitativo del establecimiento bacteriano en vivero	76
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>87</b>
	REFERENCIAS	88
	ANEXOS	94

## INDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Bosque Altoandino	25
Figura 2. <i>Vallea stipularis</i>	27
Figura 3. <i>Escallonia paniculata</i>	28
Figura 4. Relación de los disturbios naturales y antrópicos con la dinámica de los ecosistemas	30
Figura 5. Proceso de degradación de los suelos	32
Figura 6. Mecanismos de acción directa de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal	33
Figura 7. Mecanismos de acción indirecta de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal	33
Figura 8. Composición del aire atmosférico	34
Figura 9. Distribución de nitrógeno en la Tierra	35
Figura 10. Relación del ciclo del nitrógeno y los componentes orgánicos y minerales	35
Figura 11. Amonificación y nitrificación	36
Figura 12. Método colorimétrico Fenol-hipoclorito	39
Figura 13. Reacción colorimétrica de Salkowski	40
Figura 14. <i>Pseudomonas</i> sp.	41
Figura 15. Células especializadas de <i>Anabaena</i> sp. donde tiene lugar la fijación de nitrógeno	41
Figura 16. Raíces mostrando nódulos que contienen rizobios fijadores de nitrógeno	42
Figura 17. Planta (alfalfa), mismo suelo, e iguales condiciones de crecimiento. La diferencia entre “verde” y “amarillas” se debió a la inoculación de las primeras con bacterias fijadoras de nitrógeno.	43
Figura 18. Ubicación geográfica de la zona de muestreo	47



Figura 19. Representación gráfica experimento en vivero por especie	52
Figura 20. Clasificación del total de colonias aisladas según tinción de Gram. y número de colonias aisladas en cada medio.	55
Figura 21. Curva de calibración a partir de Ácido Indol Acético comercial	65
Figura 22. Reacción colorimétrica de producción de AIA por las rizobacterias.	65
Figura 23. Curva de calibración a partir de un patrón de cloruro de amonio. (NH <sub>4</sub> Cl).	67
Figura 24. Reacción colorimétrica de producción de ión amonio por las rizobacterias.	67
Figura 25. Preparación e incubación de bioinóculos.	69
Figura 26. Curvas de crecimiento bioinóculos.	69
Figura 27. Especies vegetales en vivero	72
Figura 28. Análisis de varianza (ANOVA) de los datos de altura al día 90. ( <i>Escallonia paniculata</i> )	75
Figura 29. ANOVA simple de los datos de número de hojas en día 90	76
Figura 30. ANOVA simple del grosor en el día 90. ( <i>Escallonia paniculata</i> )	76
Figura 31. ANOVA simple de la altura de <i>Vallea stipularis</i> al día 90.	77
Figura 32. Registro fotográfico de establecimiento bacteriano 30 días después de la inoculación	77
Figura 33. Registro fotográfico de establecimiento bacteriano 60 días después de la inoculación	78
Figura 34. Registro fotográfico de establecimiento bacteriano en vivero 90 días después de la inoculación	78

## INDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de las dos especies seleccionadas para el bioensayo en vivero.	29
Tabla 2. Variables e indicadores en estudio.	46
Tabla 3. Formulaciones de Reactivo Salkowski evaluadas en el ensayo.	49
Tabla 4. Características fisicoquímicas de los suelos analizados	54
Tabla 5. Descripción macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas de la colonias aisladas a partir de la muestra 1.	54
Tabla 6. Descripción macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas de la colonias aisladas a partir de la muestra 2.	58
Tabla 7. Producción de AIA de las rizobacterias aisladas.	66
Tabla 8. Producción de ión amonio por parte de las rizobacterias Seleccionadas	68
Tabla 9. Conteo de UFC de cada bioinóculo.	68
Tabla 10. Identificación de las rizobacterias seleccionadas por medio del panel BBL CRYSTAL	71
Tabla 11. Registro fotográfico de las dos especies vegetales en vivero durante los tiempos evaluados.	72

## LISTA DE ANEXOS

	PAG.
Anexo 1. Composición de medios	95
Anexo 2. Registro de las Rizobacterias Fijadoras de Nitrógeno purificadas y criopreservadas. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA)	96
Anexo 3. Curva de calibración y tabla de absorbancias AIA	97
Anexo 4. Curva de calibración y tabla de absorbancias ión amonio.	97
Anexo 5. Medición de densidad óptica para las curvas de crecimiento de los bioinóculos.	98
Anexo 6. Panel bioquímico BBL Crystal E/NF para identificación de las rizobacterias seleccionadas para ensayo en vivero.	98
Anexo 7. Formato de recolección de datos para cada especie.	99
Anexo 8. Gráficas de análisis estadístico para <i>Escallonia paniculata</i>	101
Anexo 9. Gráficas de análisis estadístico para <i>Vallea stipularis</i> .	102

## RESUMEN

En este trabajo se aislaron 33 rizobacterias en los medios específicos ASHBY, NFB y JMV, a partir de suelo de Bosque Altoandino de Usme, con el fin de evaluar su capacidad fijadora de nitrógeno y su aporte al crecimiento de especies vegetales nativas de este ecosistema. Se caracterizaron morfológicamente y se determinó la producción de Ácido Indol Acético (AIA) y amonio, mediante el método de Salkowski y el método colorimétrico de Berthelot, respectivamente.

Todas las rizobacterias aisladas evidenciaron producción de AIA entre 3.37 y 11.87 ug/mL y de amonio entre 0,37 y 7,99 ug/mL. Se seleccionaron las 5 rizobacterias con mayor actividad, se usaron en la producción de bioinóculos y se identificaron como *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* y *Klebsiella oxytoca*.

Los bioinóculos simples se aplicaron a plántulas de las especies vegetales nativas *Escallonia paniculata* y *Vallea stipularis*, para establecer su efecto en la promoción del crecimiento vegetal, mediante el análisis de los parámetros de altura, número de hojas y grosor. Para la primera especie se encontró que la diferencia en el crecimiento de las plantas inoculadas frente a las plantas control fue estadísticamente significativa al día 90 ( $P= 0,001$ ), siendo *Enterobacter sakazakii* y *Klebsiella oxytoca* las más efectivas. Para *Vallea stipularis* durante el tiempo de seguimiento se observaron diferencias frente a los controles, pero estas no fueron estadísticamente significativas ( $P=0,65$ ). Por lo cual se pudo concluir que el crecimiento de plantas usadas en restauración ecológica puede ser apoyado con el uso de rizobacterias fijadoras de nitrógeno.

Palabras clave: Rizobacterias, restauración ecológica, enzima nitrogenasa, Ácido Indol Acético.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Bosque Altoandino está ubicado en las zonas más frías del país entre los 2900 y los 3800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Posee una gran variedad de fauna y flora, muy importante en la diversidad biológica que caracteriza nuestro país; su elevada altura es fundamental para la conservación de muchas especies de plantas y animales, que se desarrollan de forma óptima en estas condiciones y por ende no se encuentran en ningún otro lugar.

A pesar de que brinda importantes servicios ambientales como refugio de biodiversidad y protección de cuencas hidrográficas, éste se ve cada vez más afectado por actividades humanas que buscan sacar el mayor provecho de los recursos naturales que allí se encuentran. Dichas actividades incluyen prácticas agropecuarias inapropiadas, pastoreo extensivo de ganado vacuno y ovino, quemas periódicas y extracción selectiva de plantas leñosas para ser usadas como materias primas maderables. De ahí que, actualmente en Colombia perduran menos del 5% de los Bosques Altoandinos y el área de aquellos que aún perduran, ha perdido más del 70% de su cobertura original; generando numerosos efectos negativos como la alteración de la diversidad de fauna y flora, el deterioro de los suelos, el agotamiento del recurso hídrico y la disminución de la microbiota, que es bastante importante en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas.

Particularmente, las bacterias rizosféricas aportan al crecimiento de las plantas mediante procesos como fijación de nitrógeno y síntesis de fitohormonas. Estas rizobacterias generalmente presentan inactividad en suelos deteriorados. Sin embargo, al ser recuperadas de manera adecuada en sus ambientes nativos es posible potenciar su actividad metabólica; afirmación usada como base para el planteamiento de este trabajo, en el que se implementó una estrategia de restauración ecológica asistida, que consistió en el aislamiento de rizobacterias fijadoras de nitrógeno con potencial productor de Ácido Indol Acético a partir del entorno a intervenir, para aprovechar sus capacidades metabólicas en el crecimiento de las especies vegetales a usar en el proceso de restauración.

Teniendo en cuenta que muchos de los esfuerzos por recuperar los escenarios deteriorados se ven frustrados por problemas de adaptación de las especies nativas en los ecosistemas, se espera que mediante este estudio se puedan generar alternativas que favorezcan y faciliten la implementación de proyectos de restauración ecológica de diferentes ecosistemas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de rizobacterias nativas de Bosque Altoandino de Usme, como aporte al crecimiento de especies vegetales nativas a usar en un proceso de restauración ecológica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar las rizobacterias con capacidad fijadora de nitrógeno nativas de Bosque Altoandino de Usme.

Seleccionar las rizobacterias a usar en el proceso de restauración ecológica de acuerdo a su potencial de fijación del nitrógeno *in vitro*.

Establecer el aporte de las bacterias seleccionadas en el crecimiento de las especies vegetales nativas de Bosque Altoandino de Usme a escala de vivero.

### 3. ANTECEDENTES

La literatura presenta gran cantidad de estudios acerca de bacterias fijadoras de nitrógeno y su aporte al crecimiento vegetal. Los trabajos publicados hacen referencia en su mayoría, al uso de estos microorganismos en suelos agrícolas y tan solo algunos estudian el área forestal. No obstante, todos abordan técnicas que permiten el aislamiento e identificación de estos microorganismos, la posterior medición y cuantificación de hormonas y enzimas involucradas, tanto en el proceso de fijación de nitrógeno como en la promoción del crecimiento vegetal. A continuación se presentan los estudios relevantes en cuanto a bacterias fijadoras de nitrógeno y su inoculación en especies vegetales, siguiendo un orden temático y no cronológico.

Shrimant B. (2012), en su revisión sobre microorganismos fijadores de nitrógeno, realiza una recopilación sobre los aspectos más importantes en la fijación biológica del nitrógeno. Los temas tratados por este autor son, la importancia del nitrógeno en forma disponible para la captación por parte de la planta, los microorganismos capaces de realizar este proceso, el mecanismo por el cual logran hacerlo, y las diferentes ubicaciones que pueden tener dentro del ecosistema. Llama la atención la descripción que hace de algunos de los géneros más importantes reconocidos como fijadores de nitrógeno asimbióticos, como *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., y sus efectos sobre el crecimiento de la planta. Adicionalmente, hace énfasis no solo en los beneficios de este proceso para la planta, sino también para la estabilidad de la actividad biológica del suelo y en general del ecosistema. Finalmente, concluye constatando la importancia del uso de estos microorganismos como biofertilizantes, ya que estos, a diferencia de los fertilizantes químicos, enriquecen el suelo y son respetuosos con el medio ambiente. (1)

Las bacterias fijadoras de nitrógeno al ser usadas en la regeneración artificial de bosques, incrementan el desarrollo de plántulas de diferentes especies. En este sentido, Orozco y Martínez (2009), determinaron el efecto de microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos, sobre las variables vegetales: altura, número de hojas, biomasa aérea, biomasa radicular y contenido de nitrógeno del suelo y foliar en la especie forestal, *Pinus patula*. El estudio fue realizado en invernadero



usando un inóculo conformado por bacterias fijadoras libres de nitrógeno, aisladas de la rizósfera de *P. patula* e identificadas sugerentemente por pruebas bioquímicas como *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus macerans*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas* sp. Los resultados mostraron mayor captación de nitrógeno en las plantas inoculadas, obteniendo *A. chroococcum* los mejores promedios en casi todas las variables vegetales. También evaluaron la actividad de la enzima nitrogenasa mediante la reducción de acetileno, midiendo la producción de etileno por cromatografía de gases, en la cual *Bacillus macerans*, *E. agglomerans* y *A. chroococcum* presentaron la mayor actividad a las tres horas de incubación con acetileno. (2)

De manera semejante, Martínez y García (2010), aislaron una cantidad considerable de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo, de la rizósfera de dos especies forestales nativas de Bosque Altoandino: *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*, caracterizadas por presentar dificultad para su establecimiento, y en general para su crecimiento. Las bacterias aisladas se agruparon en consorcios de acuerdo a sus propiedades y se inocularon en las plantas a tratar, en las cuales observaron un aumento significativo en el crecimiento longitudinal frente a las plantas no inoculadas, generando una idea del potencial de estos microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal y por tanto, de su uso como materia prima para la producción de posibles biofertilizantes. Además, generaron una visión sobre el papel de las bacterias diazotróficas en la rehabilitación y sustentabilidad de suelos forestales degradados y la importancia de crear nuevos conocimientos sobre microorganismos promotores de crecimiento vegetal en especies forestales. (3)

Por su parte Moreno y colaboradores (2013), aislaron 32 cepas nativas de bacterias diazótroficas de muestras de suelos rizosféricos correspondientes a cultivos de pastos (*Cynodon dactylon*), café (*Coffea*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*) y frutales, en los medios Winogradsky y Ashby. Los microorganismos fueron identificados bioquímicamente con el sistema BBL Crystal encontrando en su mayoría *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia fonticola*. Adicionalmente realizaron identificación

molecular por PCR donde se pudo observar que en algunos de los casos la caracterización bioquímica no coincidía con los hallazgos de la PCR. Finalmente evaluaron el efecto biofertilizante de los aislados sobre plantas de maíz donde se pudo observar que los mejores resultados en el aumento del diámetro del tallo y la longitud de las hojas y los tallos eran producidos por *S. maltophilia*. (4)

Mantilla y colaboradores (2009), realizaron el aislamiento primario de microorganismos fijadores de nitrógeno, en medios libres de este elemento, de suelos con tres coberturas vegetales diferentes: pastizal, bosque y chagra, en diferentes paisajes del sur de la Amazonia colombiana. Resaltaron que aunque hay una gran variedad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de la rizósfera de varios cultivos, existe un interés creciente en buscar nuevas cepas con cualidades especiales, que actúen eficientemente en suelos degradados. En el estudio obtuvieron un mayor recuento de bacterias en la cobertura de pastizal, seguida de la de bosque, sin embargo, las variedades morfológicas eran más notables en la muestra de bosque, lo cual implicó un mayor número de aislamientos primarios en ésta, que posteriormente fueron evaluados mediante el ensayo de reducción de acetileno. Adicionalmente, relacionaron la información encontrada sobre el número y tipo de microorganismos con la distribución de los mismos en los diferentes sitios muestreados y las variables fisicoquímicas del suelo. (5)

Avellaneda y Torres (2015) lograron realizar una caracterización bacteriana de suelo de diferentes usos, dividiendo los microorganismos encontrados en los grupos funcionales: fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y celulíticos. El estudio fue realizado en la vereda El Bosque del Parque Nacional Natural de Los Nevados, Colombia, la cual presenta páramos y bosques Altoandinos asociados a la cuenca alta del río Otún. Las muestras analizadas fueron recolectadas de tres suelos (cultivo de papa, ganadería y páramo), en los cuales hallaron microorganismos de los tres grupos funcionales. Dentro de los microorganismos fijadores de nitrógeno, los géneros más encontrados fueron *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. y *Burkholderia* sp. (6)

Argüello y colaboradores (2016) en su investigación cuantificaron bacterias diazótroficas mediante la técnica del Número Más Probable y compararon fisicoquímicamente suelos rizosféricos de tres cacaotales (*Theobroma cacao* L.)

del Departamento Norte de Santander, Colombia. Los autores resaltaron el papel de las bacterias rizosféricas en el mejoramiento de la calidad del suelo, favoreciendo el desarrollo y nutrición de las plantas y el aumento de la tolerancia de éstas, frente al estrés. La cuantificación de bacterias diazótrofes reportó mayores poblaciones presuntivamente de los géneros *Azospirillum* sp. y *Burkholderia* sp., los cuales abundan en la zona de rizósfera, respecto a los géneros *Herbaspirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. caracterizados por su naturaleza endófitas. Adicionalmente, concluyen que las condiciones físico-químicas del suelo, el contenido de materia orgánica, la humedad, el riego, el pH, y las relaciones climáticas, condicionan la cantidad y variedad de bacterias presentes en el suelo que pueden representar un beneficio para las plantas. (7)

En el trabajo realizado por López (2011), inocularon plantas leñosas de carácter forestal mediante la suspensión de la raíz en inóculos preparados con cepas bacterianas descritas como promotoras, esperando favorecer su crecimiento. Pudieron evidenciar que el efecto de las bacterias no siempre es el esperado, si no se tienen en cuenta condiciones básicas para la ejecución de su metabolismo, ya que en algunas plantas del ensayo no se observó un beneficio y en otras, contrario a la hipótesis inicial, el efecto fue perjudicial. Es de resaltar que las especies arbóreas inoculadas pertenecían a otras condiciones climáticas y edáficas, por ende el comportamiento y la acción de las bacterias puede diferir. Por ello, recomiendan realizar los ensayos en el ambiente nativo de las especies forestales que se pretende favorecer y de donde se aíslan los microorganismos.(8) De la misma manera, Ma y Torres (2013), al evaluar la eficiencia de un grupo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de una pradera diferente a la de su ensayo, concluyen que en el proceso de aplicación de inóculos se debe tener en cuenta tanto los factores que garantizan la adaptación bacteria – planta, como el comportamiento de cada género bacteriano frente a las condiciones edafoclimáticas que demande la zona en estudio. (9)

Ya que existe poca información al respecto, Barreto y colaboradores (2007) añadieron información a la literatura, acerca de la promoción de crecimiento vegetal en especies forestales por parte de las rizobacterias asociadas a *Anacardium excelsum*, árbol de bosque seco tropical de Colombia. Este trabajo

buscó aislar rizobacterias y utilizarlas en el diseño de inóculos para estimular la germinación de las semillas, el crecimiento y la nutrición vegetal, logrando enriquecer la población microbiana asociada a la rizósfera en suelos en proceso de reforestación. Seleccionaron tres morfotipos identificados por pruebas bioquímicas como *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*. Obtuvieron el biopreparado por medio de fermentación, empleando sustratos para asemejar las condiciones ambientales. Los biopreparados aceleraron la germinación de las semillas, lo que favoreció el proceso de reforestación reduciendo el tiempo. En cuanto al crecimiento vegetal, estos inóculos no tuvieron un efecto marcado en el largo de la raíz pero si en el follaje, indicando un efecto nutricional pero no hormonal, coincidiendo con la capacidad solubilizadora de fosfato y fijadora de nitrógeno reportada para estas cepas. (10)

Reafirmando la capacidad de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el favorecimiento de especies forestales, Ángulo y colaboradores (2014), aislaron bacterias rizosféricas y endófitas de árboles de *Eucalyptus nitens*, con el objetivo de caracterizarlas y determinar su capacidad productora de fitohormonas como AIA y giberelinas, además de otros mecanismos de acción asociados a la promoción de crecimiento de las plantas. Este aislamiento lo realizaron a partir de raíces jóvenes y tejidos vegetales en diferentes medios de cultivo, para luego contar, seleccionar y traspasar las colonias con morfotipos diferentes, al mismo medio del que fueron aisladas. En el ensayo de promoción de crecimiento en invernadero, produjeron inóculos bacterianos con cada una de las bacterias aisladas. Los inóculos fueron empleados en semillas de *E. nitens* con el fin de evaluar la emergencia de las plántulas, altura de la parte aérea, largo de raíces y peso seco, ya que la supervivencia de las plantaciones forestales depende de la capacidad de las plántulas producidas en vivero para tolerar el estrés producto del trasplante. A las bacterias que promovieron el crecimiento de las plántulas, las identificaron por métodos genómicos y confirmaron cuantitativamente la producción de AIA con cromatografía líquida de alta eficacia, demostrando que las bacterias rizosféricas y endófitas de *E. nitens* estimulan la emergencia y el crecimiento de plántulas de esta especie en condiciones de invernadero. (11)

Los inóculos biológicos constituyen una gran alternativa para suministrar

elementos y mejorar los cultivos. Kassa y colaboradores (2005), en su estudio comprueban que la inoculación con *Azotobacter sp.*, uno de los géneros bacterianos conocidos como fijadores de nitrógeno, promueve el crecimiento de las plantas. Su objetivo era aislar dos de los microorganismos más conocidos como promotores de crecimiento vegetal, *Azotobacter* (bacteria) y *Trichoderma* (hongo) para su cribado y caracterización molecular, demostrando posteriormente sus actividades benéficas. Luego del aislamiento presuntivo de estos dos géneros, realizaron la identificación de los mismos, mediante morfología y pruebas bioquímicas, brindando una descripción detallada de los resultados que se deben obtener si se trata de *Azotobacter sp.* o de *Trichoderma sp.* Para la caracterización molecular, llevaron a cabo la extracción de ADN de cada aislamiento y amplificaron por PCR, encontrando 35 bandas con 85,59% polimórfico en *Azotobacter* y 29 bandas con 78,37% polimórfico en *Trichoderma*. (12)

Los aislamientos fueron inoculados en conjunto (*Azotobacter sp.* y *Trichoderma sp.*) en dos plantas diferentes en las que evaluaron el crecimiento cada 15 días hasta el momento de cosecha. Al comparar las plantas control con las inoculadas, observaron un crecimiento significativamente superior en las inoculadas, concluyendo así que la combinación de estos dos microorganismos puede usarse como biofertilizante y como agente de biocontrol. (12)

Argüello y Moreno (2014) desarrollaron cultivos puros de bacterias diazótrofes con posible potencial biofertilizante, a partir de muestras de suelo rizosférico de plantaciones de cacao. Inicialmente caracterizaron morfológica y bioquímicamente las colonias y evaluaron la capacidad fijadora de nitrógeno de los aislados mediante el método de micro-Kjeldhal modificado. Las bacterias con mayor actividad de la enzima nitrogenasa se utilizaron en la producción de bioinóculos, en los cuales se sumergían las semillas seleccionadas por un tiempo determinado, encontrando que éstos promovían significativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas de cacao, así como una mayor concentración de nitrógeno en sus tejidos, en comparación con el testigo. Teniendo en cuenta lo anterior, describieron la relevancia de realizar estudios en los que se identifiquen bacterias fijadoras de nitrógeno nativas de los suelos, que aseguren mayor adaptabilidad, supervivencia y establecimiento de las plantas y

promuevan la acción benéfica a nivel de la rizósfera con el fin de mejorar los resultados económicos y ambientales, según corresponda. (13)

Así mismo, Escobar y colaboradores (2011), realizaron un estudio en el que se caracterizó y determinó el efecto de cepas nativas de *Azotobacter* sp., en el desarrollo vegetativo del cultivo de tomate, para reducir el uso de fertilizantes químicos. Evidenciaron que este género bacteriano, debido a que cuenta con la capacidad de fijar nitrógeno y producir Ácido indol acético (AIA), incrementa de manera significativa la altura, volumen radicular, materia seca total y parte aérea de las plantas tratadas frente al testigo absoluto, mejorando de esta manera la producción del cultivo. (14)

Moreno y colaboradores (2014), evaluaron el efecto de la variedad de temperaturas de conservación (2-30 °C) en la viabilidad y actividad biológica de las cepas bacterianas (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* y *Bradyrhizobium japonicum*) simbióticas fijadoras de nitrógeno, empleadas como inoculantes sólidos con base en turba en los cultivos de arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). Posterior a la reactivación de las cepas, realizaron un control de pureza de las mismas, para luego almacenarlas a diferentes temperaturas durante 180 días. Pasado el tiempo, observaron una óptima supervivencia de las rizobacterias y una notable efectividad en la fijación biológica de nitrógeno, determinada por el aumento de la biomasa foliar y radical de las plantas y por la actividad del complejo enzimático nitrogenasa, evidenciada en las raíces noduladas gracias a la reducción de acetileno observada en un cromatógrafo de gases. Todo esto fue independiente de las diferentes temperaturas de almacenamiento, lo que indicó la gran capacidad promotora de crecimiento de las bacterias diazotróficas. (15)

Lara y colaboradores (2007), usaron el método colorimétrico de Berthelot (fenol-hipoclorito) para medir la capacidad fijadora de nitrógeno en 36 microorganismos de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp, aislados de la zona agrícola de San Carlos, Córdoba (Colombia). De los 21 microorganismos identificados dentro del género *Azotobacter* sp, las máximas concentraciones encontradas del ion amonio fueron 5.15 mg/l y 5.17 mg/l; y de los 15 microorganismos identificados dentro del género *Azospirillum* sp, la máxima concentración encontrada del ion amonio fue de 4,67 mg/l. De esta manera, concluyen que los

microorganismos encontrados con mayor producción del ion amonio, son los más eficientes en la fijación biológica del nitrógeno. (16)

Por otra parte, Bashan y colaboradores (2008), hacen una revisión titulada “Environmental uses of plant growth-promoting bacteria” cuyo objetivo es dar a conocer los potenciales beneficios ambientales de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB). Inicialmente hacen énfasis en sus ampliamente estudiados usos en la agricultura, para mejorar el rendimiento de los cultivos, mencionando algunos de los mecanismos usados por estas bacterias para promover el crecimiento vegetal. Posteriormente, nombran los diferentes beneficios ambientales de estas bacterias, como la biorremediación de aguas residuales, en la que actúa el género *Azospirillum*, que al ser inoculado en la zona a tratar, mejora la biorremediación con microalgas, aumentando la proliferación y el metabolismo de las mismas y de esta manera su eficacia en la limpieza de las aguas residuales. Otro beneficio ambiental se evidencia en el tratamiento de áreas desérticas degradadas, donde encontraron que diversos géneros de bacterias aisladas de zonas extremadamente secas, mejoraron la supervivencia de las plántulas de cactus plantadas en estas, logrando así su revegetación y evitando la erosión. Adicionalmente, se puede reducir la contaminación ambiental por metales pesados, con la inoculación de PGPB en plantas. (17)

En cuanto a procesos de restauración ecológica llevados a cabo en bosque Altoandino, Montenegro y colaboradores (2008) en su estudio “Atributos vitales de especies leñosas en bordes de bosque Altoandino de la Reserva Forestal de Cagua (Colombia)”, describen la necesidad tanto de lograr expandir e integrar los fragmentos de este tipo de bosque, como de conocer y caracterizar apropiadamente las especies y condiciones originales del mismo. (18)

Delgado y Moreno (2010), determinaron el efecto de dos tipos de restauración sobre dos grupos funcionales: fijadores de nitrógeno y proteolíticos. El proceso de restauración se implementó en una zona del Parque Nacional Natural de los Nevados que fue afectada por un incendio en el 2006. El estudio fue realizado un año después de iniciar el proceso de restauración, analizando en iguales condiciones muestras de suelo en áreas con restauración activa y áreas con restauración pasiva, evaluando tanto densidad como actividad microbiana de los

dos grupos microbianos. Al final del estudio encontraron que efectivamente el tipo de restauración tiene un efecto sobre la densidad y actividad de los dos grupos funcionales, indicando que en la restauración activa encontraron mayor densidad y actividad microbiana tanto para fijadores de nitrógeno como para proteolíticos. (19)

Franco y Colaboradores (2010), lograron caracterizar florística y fisionómicamente los remanentes de bosque andino de una reserva natural, que hace parte de la zona de amortiguación del Parque Nacional Natural Los Nevados (PNNN), en la Cordillera Central de los Andes colombianos, confirmando que el bosque Altoandino presenta un menor número de especies por el aumento en la altitud y la fragmentación de los bosques a causa de la intervención antrópica. (20)



## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 EL BOSQUE ALTOANDINO COLOMBIANO

Colombia es uno de los países del mundo con mayor biodiversidad, pues el 68,7% de su superficie está cubierta por ecosistemas naturales, en los cuales reside una abundante variedad de especies vegetales y animales (21). Uno de esos ecosistemas es el Bosque Altoandino (Figura 1), también conocido como bosque de niebla; se encuentra ubicado en las zonas frías del país en la cordillera de Los Andes; está por encima de los 2.800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) y por debajo de los 3.500 m.s.n.m., es decir, bajo el límite del páramo. Presenta temperaturas entre 8 y 13 °C así como un alto grado de humedad. Se denomina también bosque de niebla debido a la capa de niebla que lo cubre constantemente, por presencia del aire ascendente saturado de vapor que proviene de las regiones bajas, húmedas y cálidas, que forman nubosidad al condensarse (22).

Figura 1. Bosque Altoandino. Tomado de Guía metodológica para la restauración ecológica del bosque Altoandino (22).



Se estima que en Colombia la vegetación andina representa el 29% de la flora total, con una extensión potencial de 184.710 Km<sup>2</sup>, por lo tanto allí se mantiene una cantidad considerable de la biodiversidad del país. Sin embargo, “algunos estimativos indican que en Colombia queda solo 10% de los bosques andinos originales y 5.0% de bosques Altoandinos” (22).

El bosque Altoandino es hábitat de una elevada cantidad de especies animales y vegetales pequeñas, frágiles y algunas en peligro de extinción. La mayoría de estas especies son endémicas, pues las características de este ecosistema

(altura sobre el nivel del mar, temperatura, humedad, radiación solar, etc.) son fundamentales para el desarrollo y supervivencia de estas especies y por ende no se encuentran en ningún otro lugar del mundo (23).

Su cobertura vegetal está formada por gran variedad de especies de árboles, arbustos, con una altura entre 3.0 12 m, que presentan abundancia de epífitas, musgos y líquenes en sus ramas y troncos, los cuales captan agua de la neblina del bosque y aportan a la diversidad en flora del ecosistema. En la cubierta del bosque se encuentran arrayanes (*Luma apiculata*), dragos (*Dracaena draco*), amarraboyos (*Meriania nobilis*), zarros (*Cyathea microdunta*), chagualos (*Myrsine guianensis*), sietecueros (*Tibouchina lepidota*), robles (*Quercus*), laureles (*Laurus nobilis*), encenillos (*Weinmannia tomentosa*), carates (*Vismia baccifera*), chaquiros (*Podocarpus oleifolius*), palmas de cera (*Ceroxylon quindiuense*), entre otros. El piso, presenta alto contenido de materia orgánica y un sistema radicular denso y profundo, por lo que tiene elevada capacidad de infiltración y almacenamiento de agua, adicionalmente, está cubierto de musgos (*Bryophyta*), selaginellas, colchón de pobre (*Lycopodium clavatum*) y muchas otras plantas que funcionan como esponjas y absorben y acumulan bastante agua que origina riachuelos, quebradas y ríos que descienden a las zonas bajas (21).

La importancia de este bosque radica en el refugio de esta gran variedad de especies animales y vegetales, cumpliendo otras funciones específicas acumulando nutrientes, regulando el flujo hídrico que procede de los páramos, controlando inundaciones, entre otras (23). Estas funciones ecosistémicas están relacionadas con flujos de organismos, materia y energía que se ven afectados por eventos destructivos (disturbios) de origen natural y/o antrópico (22).

#### 4.2 ÁRBOLES NATIVOS DE BOSQUE ALTOANDINO EMPLEADOS EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA

La plantación de árboles nativos o de especies pioneras dominantes y de importancia ecológica puede iniciar una rehabilitación de un área forestal disturbada. En la selección de estas especies nativas se deben tener en cuenta los rasgos de historia de vida de cada una de ellas, la adaptación y supervivencia que ofrece la plantación. (22)

Se pueden evaluar las especies leñosas nativas presentes en parches de bosques nativos, teniendo en cuenta los rasgos de hoja de vida para su selección. Rasgos como el ciclo de vida, modo de crecimiento, tolerancia a la luz, sociabilidad con individuos de la misma especie, asociación con otras especies, altura, tipo de polinización, tipo de dispersión, tipo de hoja, área foliar específica, nivel de ataque fitopatológico, etc. (24).

Dentro de las especies claves para la restauración ecológica de bosque Altoandino se encuentran las especies leñosas, *Vallea stipularis* y *Escallonia paniculata*. Ver clasificación taxonómica en Tabla 1.

#### 4.2.1 *Vallea stipularis*.

Es una especie nativa que crece en las cordilleras Central y Oriental entre los 2.400 y los 3.400 msnm. Alcanza los 15 m de altura y los 40 cm de diámetro en su tronco torcido, su corteza es escamosa y de color grisáceo; su copa es redonda; y el follaje verde rojizo. Las hojas miden 8.0 cm de largo por 4.0 cm de ancho, son simples, alternas, acorazonadas, verdes, poseen vellosidades donde nacen sus nervaduras y su borde es entero. Las flores miden 1.5 cm de diámetro, son rosadas, forman una copa y se encuentran agrupadas en inflorescencias terminales en forma de racimos. Ver figura 2. (25).

Figura 2. *Vallea stipularis*. a. Estructura foliar. b. Flores. c. planta en desarrollo. Tomado de Herbario Jardín Botánico Bogotá y vegetación del Territorio CAR (24, 25)



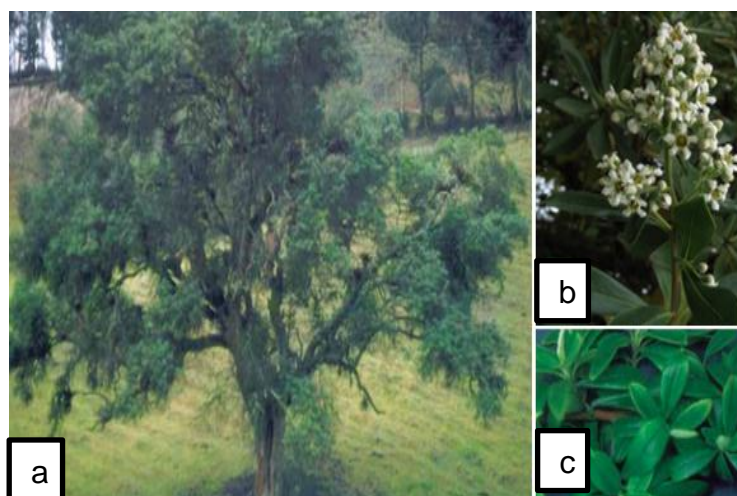
Se propagan por semillas. Los frutos se recolectan al tornarse de color pardo, se

colocan en una bolsa, se dejan secar a la sombra, se extraen sus semillas, que se siembran en semillero a 1 cm de profundidad; al medir las plántulas los 5.0 cm de altura se trasplantan a bolsas de polietileno y al alcanzar los 20 cm de altura se siembran en el lugar definitivo. Es una especie de crecimiento muy lento, requiere algo de sombra en su estado juvenil y, al madurar, abundante luz solar, prefiere los suelos fértiles y ácidos y es poco resistente a las heladas. Presenta caída y renovación del follaje; la floración, fructificación y recolección de los frutos ocurre de Abril a Agosto. Por sus atractivas flores se considera una especie ornamental. También es una especie usada en conservación del suelo y protección de cuencas por su fácil adaptación y rápido crecimiento (25).

#### 4.2.2 *Escallonia paniculata*

Es una especie nativa encontrada en las cordilleras Central y Oriental entre los 2.000 y los 3.200 msnm. El árbol alcanza los 15 m de altura y los 80 cm de diámetro en su tronco, posee corteza escamosa y de color grisáceo; su ramificación empieza a baja altura; su copa es amplia, globosa y frondosa; su ramificación empieza a baja altura; su copa es amplia, globosa y frondosa; su follaje es verde grisáceo con ramas muy abundantes y gruesas. Las hojas miden 5.0 cm de largo por 3.0 cm de ancho, son simples, alternas, su borde es entero, están dispuestas en forma de ramilletes y parecen espátulas. Las flores miden 6 mm de diámetro, poseen tonalidades de color blanco a rosado y están dispuestas en panículas terminales que miden entre los 5.0 los 20 cm de largo. Ver figura 3. (25),

Figura 3. *Escallonia paniculata*. a. Árbol. b. Flores. c. Estructura foliar. Tomado de Herbario Jardín Botánico Bogotá y vegetación del Territorio CAR (24, 25)



Su propagación se da por semillas y regeneración natural. Los frutos se recogen

cuando las flores pierden sus pétalos, se secan al sol, se extraen sus semillas, que se siembran al voleo en semillero previamente preparado con tierra, musgo y material vegetal en descomposición (humus), luego se cubren con un poco de tierra y al medir las plántulas los 5.0 cm de altura se trasplantan a bolsas de polietileno y cuando alcanzan entre los 1pastos los 20 cm se siembran en el lugar definitivo.

Es una especie de crecimiento rápido, requiere abundante luz solar, no es exigente en suelos y sus hojas perduran. La floración, fructificación y recolección de frutos ocurre desde Noviembre hasta Febrero. Se usa comúnmente como planta de protección, especialmente en las áreas costeras y para la conservación de las cuencas hidrográficas. Además, Sirve como ornamentación en parques, elaboración de carbón y ebanistería (25).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las dos especies seleccionadas para el bioensayo en vivero. (24)

TAXONOMÍA		
<b>Reino</b>	Plantae	Plantae
<b>División</b>	Tracheophyta	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Oxalidales	Escalloniales
<b>Familia</b>	Elaeocarpaceae	Escalloniaceae
<b>Género</b>	Vallea	Escallonia
<b>Epíteto específico</b>	Stipularis	Paniculata
<b>Autor del epíteto específico</b>	L.f.	(Ruiz & Pav.) Roem. & Schult.
<b>Nombre común</b>	Raque	Tibar
<b>Nombre científico</b>	<i>Vallea stipularis</i> L.f.	<i>Escallonia paniculata</i> (Ruiz & Pav.) Roem. & Schult.

### 4.3 RESTAURACIÓN ECOLÓGICA

La restauración ecológica es una disciplina científica que abarca tanto las ciencias naturales como las ciencias sociales en busca de la sostenibilidad de los ecosistemas y sistemas de producción. Esto implica restaurar la composición de especies, la estructura y la función de los ecosistemas, teniendo en cuenta las características de cada lugar, debido a su historia de uso, disturbios, potencial de regeneración, condiciones hidrológicas, estado del suelo y actividades humanas actuales (22).

En últimas la restauración ecológica es un manejo de ecosistemas que apunta a recuperar la biodiversidad y las trayectorias nativas de una región, basándose principalmente en las plantas, ya que son los productores primarios. Se debe tener en cuenta que el ecosistema difícilmente llega a su estado original, pero puede volver a una o varias de sus posibles trayectorias.

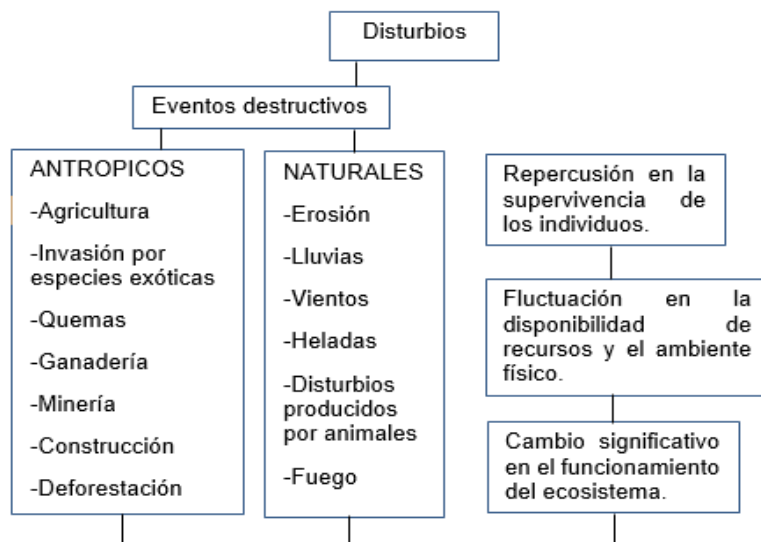
#### 4.3.1 Restauración pasiva y activa

En la restauración pasiva o sucesión natural los ecosistemas se recuperan por si solos cuando no existen barreras que lo impidan. Pero cuando los ecosistemas están muy degradados, no pueden recuperarse solos, se desvía o detiene su dinámica natural; por lo tanto, es necesario ayudar al ecosistema a superar las barreras y lograr los procesos de regeneración, lo cual se denomina restauración activa o asistida (sucesión dirigida o asistida) (23).

#### 4.3.2 Disturbio

Un ecosistema puede sufrir una variedad de disturbios (Figura 4), como el sometimiento a agricultura, invasión por especies exóticas, quemas, pastoreo, minería, entre otros. Por lo tanto, el disturbio es un evento de supresión o variación de uno o más elementos de un sistema ecológico que causa un cambio significativo en el patrón normal de éste, pues hace variar las condiciones abióticas e interfiere con su funcionamiento (22).

Figura 4. Relación de los disturbios naturales y antrópicos con la dinámica de los ecosistemas. Elaborado por los autores (2017)



#### 4.3.3 Proceso de restauración ecológica

Mediante actividades humanas intencionales y constructivas, la restauración ecológica pretende replicar lo que era un ecosistema y devolverle la capacidad de sostenerse a sí mismo. Por lo que fundamentalmente antes de la práctica es necesario un razonamiento claro, basado en la evidencia biológica y la historia del sitio en varias escalas de tiempo. Esto implica que todo proceso de restauración ecológica debe conocer las causales del deterioro, su extensión, severidad, recurrencia y las posibilidades reales de su eliminación o disminución. Así como es importante el planteamiento de objetivos concretos con el énfasis puesto en la recuperación a largo plazo (23).

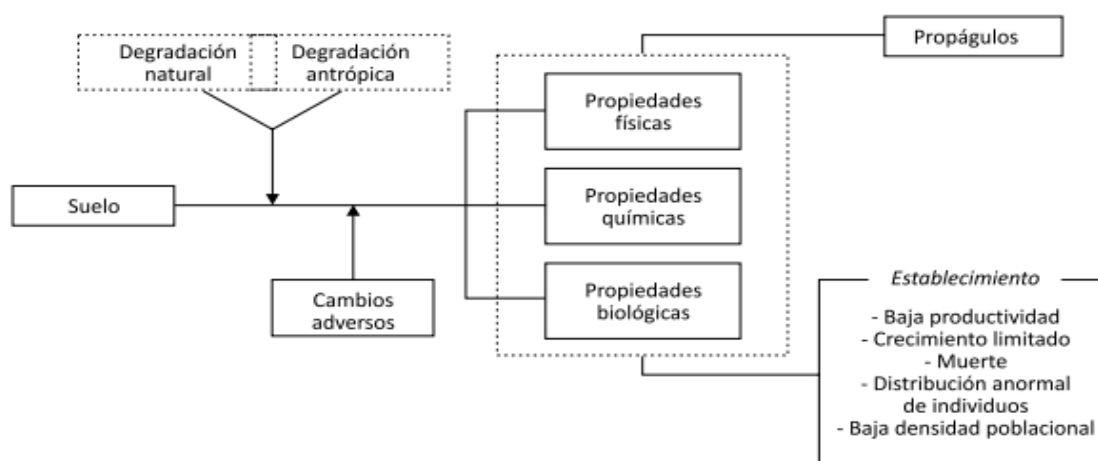
#### 4.3.4 Empleo de bacterias en restauración ecológica

Las bacterias son indicadores muy sensibles en la restauración de ecosistemas y su aumento se relaciona con la recuperación de zonas degradadas y el restablecimiento de los ciclos biogeoquímicos. En los suelos deforestados se encuentran disminuidas o ausentes las bacterias que establecen relaciones benéficas con la vegetación, lo cual dificulta el establecimiento de las plantas (3).

El uso de rizobacterias sería de gran ayuda en los programas de restauración ecológica de los ecosistemas degradados en Colombia, entendiendo la importancia de la dinámica de nutrientes en sucesión para la restauración de áreas afectadas por disturbios tanto de carácter natural como antrópico.

Las zonas deforestadas no vuelven por si solas a su vegetación original, por lo tanto, para acelerar el desarrollo vegetal es necesaria la inoculación de plántulas con poblaciones bacterianas para aportar a los programas de restauración. Las bacterias diazotróficas como *Azospirillum brasilense* son muy importantes al mejorar la nutrición de las plantas, disminuir el estrés ambiental y promover el crecimiento. (17). Esta aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) en la plantación de árboles nativos ha causado regeneración natural, aumentando la riqueza de los ecosistemas y produciendo efectos sobre las características físico-químicas y biológicas del suelo, las cuales se vieron afectadas por los cambios adversos (Figura 5) originados por la degradación del suelo (22).

Figura 5. Proceso de degradación de los suelos. (21)



#### 4.4 BACTERIAS EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL

Las bacterias que se desarrollan en el suelo y tienen la capacidad de asociarse y adaptarse a la rizósfera de las plantas, generando un efecto positivo al crecimiento y desarrollo de las mismas, mediante diferentes mecanismos moleculares incluidos en su metabolismo, se conocen como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (26).

Dichos mecanismos pueden involucrar la acción directa de los microorganismos o el desarrollo de procesos que indirectamente modifican la ambiente rizosférico beneficiando finalmente a las plantas.

##### 4.4.1 Mecanismos directos

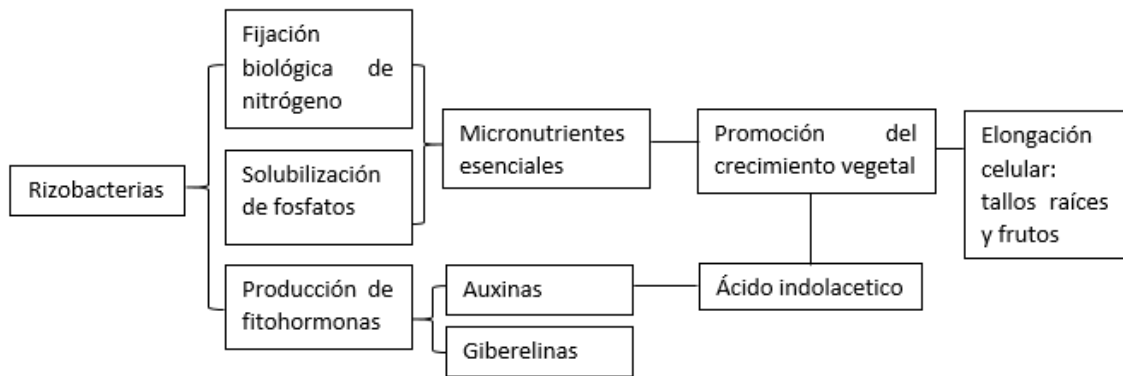
Se han descrito números mecanismos de acción directa (Figura 6) que ejercen las rizobacterias para favorecer el crecimiento vegetal. El aumento en la movilización de nutrientes solubles para las plantas como el fósforo, el mejoramiento en los procesos de absorción, el aumento de fijación de Nitrógeno y la producción de fitohormonas principalmente auxinas, giberelinas y citoquininas, son algunos de los procesos directos en que intervienen las bacterias para lograr establecer una relación sinérgica microorganismo – planta (27).

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico realizado por los PGPR constituye uno de los mecanismos más importantes teniendo en cuenta que de esta manera



se obtiene la mayor cantidad de este micronutriente esencial en el crecimiento de todos los organismos vivos. Además de la promoción de crecimiento mediante la fijación de nitrógeno, las bacterias diazotróficas utilizan como mecanismo directo la producción de fitohormonas, fundamentalmente el ácido indolacético (AIA) que se ha relacionado con la elongación celular, el desarrollo de raíces laterales y la producción de los frutos (28).

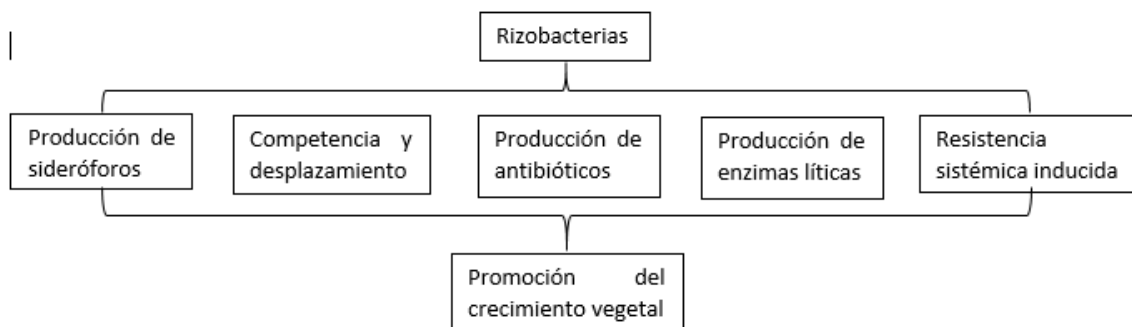
Figura 6. Mecanismos de acción directa de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Elaborados por los autores (2017)



#### 4.4.2 Mecanismos indirectos

Dentro de los efectos indirectos (Figura 7) se incluye generalmente la producción de sideróforos útiles en la captación de hierro celular y el efecto biocontrolador que pueden ejercer sobre patógenos (hongos, bacterias y virus) gracias a la producción de sustancias antibióticas, que permiten que el desarrollo de la planta no se vea afectado y mejora el número de nódulos de la raíz y el aumento de la actividad nitrogenasa, induciendo de esta manera resistencia sistémica a la planta (26).

Figura 7. Mecanismos de acción indirecta de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Elaborado por los autores (2017)

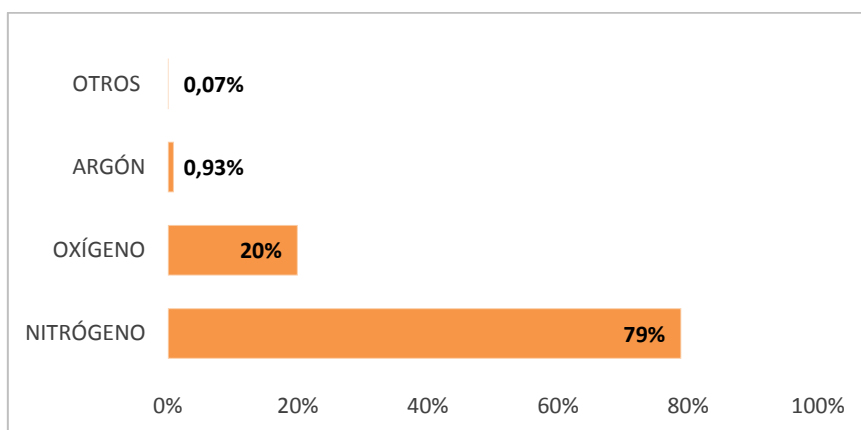


## 4.5 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO

### 4.5.1 Importancia del nitrógeno

El nitrógeno molecular compone un 79% del aire atmosférico (Figura 8), siendo este un elemento abundantemente demandado en la formación de moléculas biológicas como los ácidos nucleicos, las proteínas y las enzimas, compuestos esenciales en la formación de los seres vivos. Además, es considerado el nutriente más importante en el desarrollo vegetal, ya que las plantas requieren grandes cantidades en la producción de energía por medio de la fotosíntesis y porque se suelen encontrar carencias del elemento en los suelos. (29, 30).

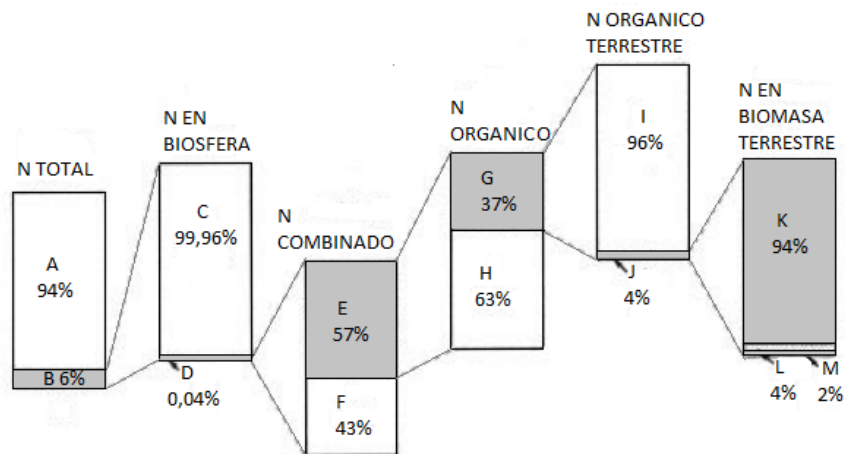
Figura 8. Composición del aire atmosférico. Elaborado por los autores (2017)



### 4.5.2 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno como nutriente cumple un proceso en el sistema suelo-planta-atmósfera, el cual se debe conocer si se pretende potenciar la eficiencia del uso del elemento en el crecimiento vegetal. Esta dinámica parte de comprender que la tierra cuenta con más de 60000 billones de toneladas de nitrógeno, de las que el 94% se encuentra en la corteza terrestre y el 6.0% restante se divide en un 99,86% presente en la atmosfera como nitrógeno molecular y un 0,04% formando compuestos orgánicos e inorgánicos en los organismos vivos, suelos y aguas (Figura 9). (31).

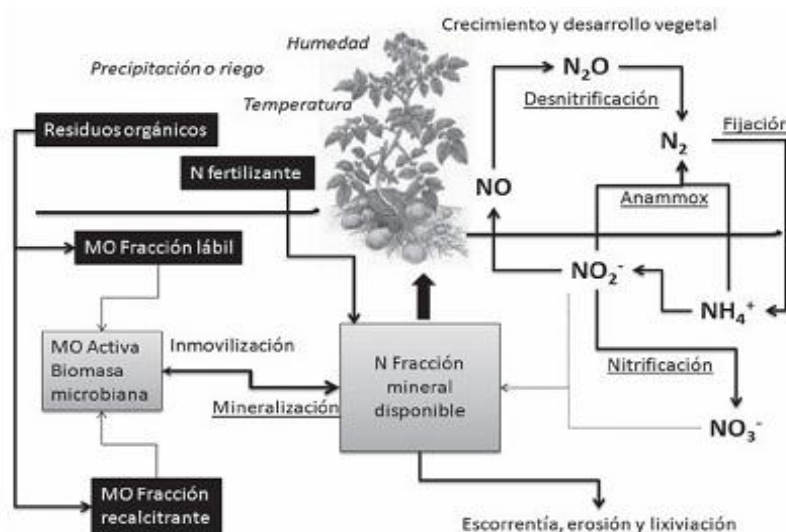
Figura 9. Distribución de nitrógeno (N) en la Tierra, expresada en porcentaje. (30).



A: corteza; B: biosfera; C: atmosférico; D: combinado; E: orgánico; F: inorgánico; G: orgánico terrestre; H: o. acuático; I: en materia orgánica muerta; J: en biomasa; K: en plantas; L: en microbios; M: en animales.

El nitrógeno molecular tiene un carácter inerte y no es utilizable por los organismos vivos, excepto por algunos microorganismos, es decir, las plantas, los animales y casi todos los microorganismos, sólo utilizan el nitrógeno en forma de compuesto químico. Tales compuestos en su forma inorgánica como los nitratos y el amonio son primordiales para las plantas, de las cuales los animales obtienen directa o indirectamente el nitrógeno orgánico requerido. Así el ciclo biogeoquímico del nitrógeno se convierte en un conjunto de transformaciones (Figura 10) por etapas que incluyen la mineralización, absorción, desnitrificación y fijación (30).

Figura 10. Relación del ciclo del nitrógeno y los componentes orgánicos y minerales. (31)

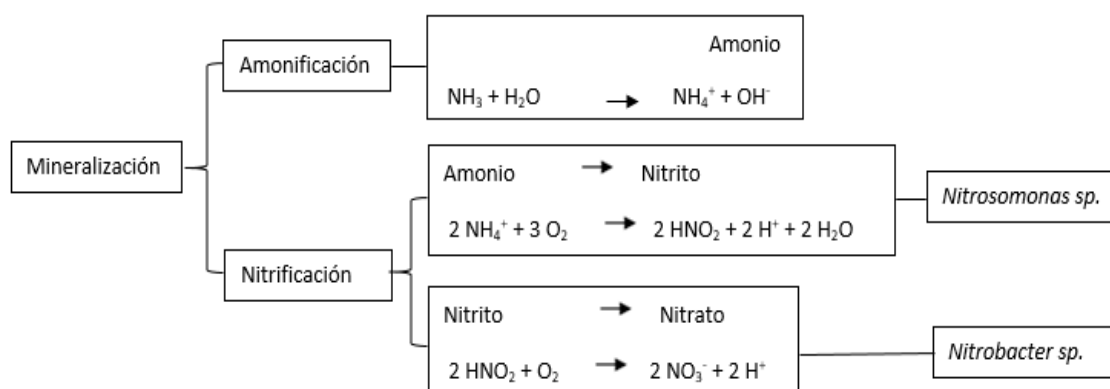


### 4.5.3 Mineralización

El nitrógeno orgánico, principalmente enzimas y aminoácidos procedentes de la descomposición de los organismos y sus excreciones es transformado en nitrógeno inorgánico, como amonio, nitrito y nitrato, por la acción de microorganismos. Esta transformación es esencial en la nutrición de las plantas y es la mayor fuente de nitrógeno en ecosistemas donde no han ocurrido disturbios.

La mineralización engloba dos procesos (Figura 11), la amonificación, que es el pasaje del nitrógeno orgánico a amonio realizada por microorganismos heterótrofos, entre los que se encuentran bacterias y hongos, y la nitrificación que se da en dos etapas consistentes en la oxidación del amonio a nitrito por bacterias del género *Nitrosomonas sp.* y la oxidación del nitrito a nitrato por acción del género *Nitrobacter sp.* (30).

Figura 11. Amonificación y Nitrificación. Elaborado por los autores (2017)



### 4.5.4 Absorción

El nitrato es la fuente de nitrógeno de mayor relevancia para las plantas. Es absorbido por estas para formar parte nuevamente de la materia viva y circular a lo largo de las cadenas alimenticias. Las enzimas nitrato-reductasas transforman el nitrato en amonio para la síntesis de aminoácidos y para evitar la pérdida del nitrato por retención del suelo y lixiviación (31).

### 4.5.5 Desnitrificación

El nitrógeno entra en la biosfera por fijación química y biológica del nitrógeno molecular y se remueve de la misma por desnitrificación. Este último es el

proceso más importante para el ciclo del nitrógeno, ya que devuelve el nitrógeno a la atmósfera, mediante la reducción biológica de nitrato a formas gaseosas, principalmente óxido nitroso y nitrógeno molecular. Este proceso ocurre en anaerobiosis, en presencia de bacterias desnitrificadoras y con disponibilidad de carbono (31).

#### 4.6 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El nitrógeno es considerado un nutriente limitante para el crecimiento de las plantas. En una planta con deficiencia de nitrógeno generalmente se observa una coloración amarillenta de tallos y hojas, falta de desarrollo y debilidad. Por el contrario, cuando la planta tiene suficiente nitrógeno, sus hojas y tallos crecen rápidamente. A pesar de que el nitrógeno hace parte de los gases que componen la atmósfera ocupando aproximadamente el 80% de esta, la mayoría de los organismos son incapaces de metabolizarlo, debido al triple enlace que posee en su estructura cuando se encuentra en estado molecular ( $N_2$ ). Por tal motivo, es necesario transformarlo a formas asimilables, de manera que mediante su absorción se pueda incluir en el metabolismo de los organismos que lo requieren (29, 32).

Dicho proceso solo puede ser llevado a cabo por microorganismos que cuentan con el material enzimático necesario para degradar el triple enlace, reduciendo la molécula y finalmente fijándola, mediante su combinación con otros elementos generando compuestos como el amoníaco, ( $NH_3$ ) amonio ( $NH_4^+$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ) o nitratos ( $NO_3^-$ ) que fácilmente se pueden incorporar a la composición del suelo y posteriormente ser metabolizados por los organismos vivos (29).

##### 4.6.1 Proceso bioquímico en la fijación biológica de nitrógeno

Los organismos fijadores de  $N_2$  también conocidos como diazótrofos llevan a cabo este proceso gracias al complejo enzimático nitrogenasa que posee dos componentes o unidades principales: la Fierro proteína o dinitrogenasa reductasa cuya función es reducir el Nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a Amoníaco ( $NH_3$ ) y la Fierro - Molibdeno proteína que proporciona la energía necesaria para que se pueda generar la reducción. Las dos proteínas del complejo son

necesarias para generar eficientemente la fijación, pero es importante tener en cuenta que además de estas, el proceso requiere una cantidad importante de energía biológica representada en moléculas de ATP, protones generando el poder reductor, y un ambiente anaerobio, ya que las proteínas del complejo enzimático son inactivadas por el Oxígeno (O<sub>2</sub>) (29, 33). La reacción general del proceso de fijación biológica de nitrógeno, se representa de la siguiente manera:

$$\text{N}_2 + 8\text{H}^{++} + 8\text{e}^{-} + 16 \text{ATP} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{ADP} + 16 \text{Pi}$$

#### 4.6.2 Estrategias de protección frente al oxígeno

Los microorganismos que poseen el complejo enzimático nitrogenasa (NASA), han generado una serie de mecanismos fisiológicos que los protegen del O<sub>2</sub> y de esta forma les garantiza su funcionamiento. Dentro de estos, cabe resaltar, la generación de un ambiente anaerobio mediante la evasión al O<sub>2</sub>, el desarrollo de barreras físicas que impiden el flujo de O<sub>2</sub> hasta las enzimas, la reducción de la concentración del O<sub>2</sub> hasta niveles tolerables por las mismas, mediante el aumento de su actividad respiratoria o la modificación genética de la enzima propiamente dicha, de tal forma que genere resistencia frente a la inactivación (29, 32, 33).

### 4.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE ACIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

#### 4.7.1 Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

El nitrógeno disponible en la atmosfera 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 12), 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 (34).

Figura 12. Método colorimétrico fenol-hipoclorito. Elaborado por los autores (2017).



#### 4.7.2 Cuantificación de ácido indol acético (AIA)

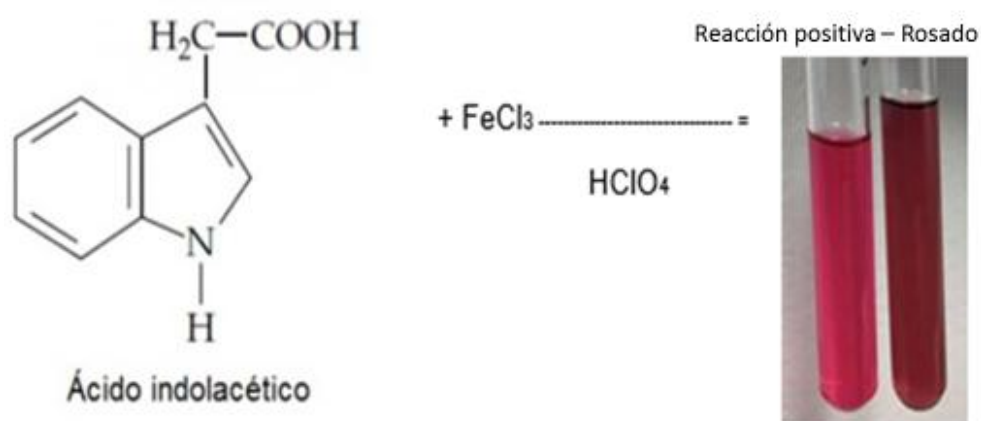
El Ácido indol acético (AIA) es una auxina natural que está presente en la mayoría de las plantas. Las auxinas son un grupo de compuestos reguladores del desarrollo de las plantas que influyen en el crecimiento, la división celular y la formación de raíces. El AIA, induce la deformación y aumento de pelos radiculares, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y desarrollo de la planta (35).

Existe una gran cantidad de bacterias que han sido catalogadas como promotoras de crecimiento vegetal, ya que logran estimular el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos, como la producción de fitohormonas. Algunas bacterias tienen la capacidad de producir AIA como parte de la realización de sus vías metabólicas; El triptófano es el principal precursor para la biosíntesis de AIA en bacterias; Estas, tienen el potencial de interferir con los procesos de incorporación de AIA en las plantas (34).

Uno de los métodos más usados para la detección de la producción de AIA en bacterias es la reacción colorimétrica de Salkowski (Figura 13). Para esto se emplea el reactivo de Salkowski, que está compuesto por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$  y agua destilada.

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. 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.

Figura 13. Reacción colorimétrica de Salkowski. Elaborado por los autores (2017).



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 530nm.

#### 4.8 MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO

Dentro del grupo de microorganismos descritos como fijadores de nitrógeno, se encuentran principalmente Bacterias, cianobacterias y actinomicetos. Cada uno



de ellos tiene la capacidad de realizar el proceso viviendo libremente, o mediante el establecimiento de relaciones simbióticas con las raíces de las plantas (formación de nódulos) (32).

Existe una gran variedad de géneros que incluyen, aerobias facultativas, anaerobias, autótrofas y heterótrofas, con hábitats diferentes y con requerimientos ambientales de temperatura, humedad, pH, etc muy heterogéneos.

#### 4.8.1 Microorganismos de vida libre

En este grupo podemos encontrar bacterias anaerobias estrictas, como *Clostridium* sp., y facultativas, como *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. (Figura 14). y *Burkholderia* sp. pero también aerobias como *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp. y *Azospirillum* sp. Se encuentran también en este grupo, arqueobacterias como *Methanosarcina* sp. y *Methanococcus* sp., y cianobacterias con (*Oscillatoria* sp. y *Gloeothecce* sp.) y sin heterocistos (*Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. (Figura 15) (29).

Figura 14. *Pseudomonas* sp. Coloración de Gram. Fotografía tomada por los autores (2016)



Figura 15. Células especializadas de *Anabaena* sp., donde tiene lugar la fijación de nitrógeno. (30.)



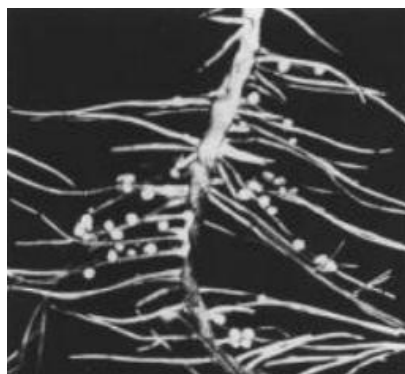
#### 4.8.2 Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno

simbióticas fijadoras de nitrógeno

Dentro de este grupo se encuentran bacterias móviles del suelo, que son atraídas hacia la raíz por compuestos que ésta libera, tales como *Rhizobium* sp., *Azorhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. Existen otros formadores de nódulos

como son: *Phyllobacterium* sp. y *Agrobacterium* sp. Los *Actinomicetos* (bacterias Gram positivas) que nodulan raíces de muchos árboles y arbustos. Son aquellas bacterias filamentosas que viven en simbiosis con plantas actinorricas (angiospermas capaces de formar nódulos). Esta nodulación (Figura 16) es de gran importancia para plantas, porque aporta nitrógeno al suelo en zonas pobres o repobladas (32, 33).

Figura 16. Raíces mostrando nódulos que contienen rizobios fijadores de nitrógeno (35).



#### 4.9 BIOINÓCULOS

Un inoculante biológico o bioinóculo es un preparado de microorganismos determinados que funciona como enmienda aplicada al suelo, para mejorar los nutrientes y su disponibilidad para el aprovechamiento de las plantas (25).

Estos bioinóculos se pueden emplear para contribuir a la reforestación, mejorando el proceso de establecimiento, nutrición y desarrollo vegetal en suelos deteriorados. Se trata de aumentar la población bacteriana asociada a la rizósfera de las plantas mediante la siembra de plantas inoculadas en vivero, que lleven en la rizósfera altas poblaciones de bacterias benéficas. De esta forma la planta reintroduce estas bacterias al suelo, aumenta su crecimiento vegetal temprano y se reduce el estrés, lo que lleva a una mayor adaptación al suelo respecto a plantas no inoculadas en vivero (Figura 17). (10)

Figura 17. Planta (alfalfa), mismo suelo, e iguales condiciones de crecimiento. La diferencia entre “verde” y “amarillas” se debió a la inoculación de las primeras con bacterias fijadoras de nitrógeno (30).



Es necesario el aislamiento de microorganismos propios de la rizósfera presentes en áreas bien conservadas, para diseñar inóculos microbianos con los cuales se puedan realizar pruebas de germinación y estimulación del crecimiento vegetal en vivero, con fines de restauración de áreas disturbadas de bosque nativo amenazado por las actividades humanas y así dar un paso más hacia la conservación (10).

El nitrógeno es un elemento necesario para el suelo y su disponibilidad para las plantas se da en pocas formas, como la fertilización química o la fijación biológica por parte de microorganismos para lograr su incorporación. Esta última se ha utilizado ampliamente para elaborar y comercializar inóculos viables que favorecen el rendimiento de los cultivos por un mejor suministro de nitrógeno (15).

La actividad biológica se evalúa mediante la medición de variables de altura, grosor del tallo, número de hojas, biomasa aérea y biomasa radicular en ensayos bajo condiciones de invernadero con temperatura promedio y humedad relativa establecida (2).

Unido a la fijación de nitrógeno es posible el aumento de la producción de fitohormonas benéficas para el crecimiento de la planta y absorción de nutrientes. Puesto que el potencial de las rizobacterias como promotoras de crecimiento de plántulas y su posible uso como inoculantes, depende de que presente más de un mecanismo que favorezca la promoción del crecimiento vegetal (35).

Las plantas provenientes de los viveros deben presentar una gran capacidad para tolerar el estrés producto del trasplante, ya que ese nuevo ambiente adverso podría ser afectar el crecimiento inicial y su supervivencia. La calidad de las plántulas producidas en vivero es considerada clave para determinar el éxito de la futura plantación, por lo que deben estar suficientemente desarrolladas para lograr establecerse (11).

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de naturaleza experimental, debido a que en un primer momento se determinaron las variables de estudio y posteriormente se sometieron a experimentación bajo condiciones particulares que se diseñaron en la prueba.

## 5.2 UNIVERSO, POBLACIÓN, MUESTRA

5.2.1 Universo. Bacterias presentes en suelo correspondiente al ecosistema de Bosque Altoandino en territorio colombiano.

5.2.2 Población. Bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en suelo tomado de la zona de restauración del corredor Chingaza – Sumapaz, que hace parte del bosque Altoandino ubicado en el parque ecotecnológico de la Universidad Antonio Nariño Sede Usme.

5.2.3 Muestra. Bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en dos muestras de suelo rizosférico de la zona de restauración. Una muestra tomada de un área sin cobertura vegetal y la otra de un área conservada en la que perduran especies nativas.

## 5.3 HIPÓTESIS, VARIABLES, INDICADORES.

Las rizobacterias con capacidad fijadora de nitrógeno favorecen significativamente el crecimiento de especies vegetales nativas de Bosque Altoandino y por ende su establecimiento dentro del ecosistema a recuperar.

Para efecto del desarrollo de la experimentación se tuvieron en cuenta las variables y sus respectivos indicadores, observadas en la tabla 2:

Tabla 2. Variables e indicadores en estudio. Elaborado por los autores, 2017.

Variable	Definición	Indicadores
		Características fisicoquímicas: - Textura

Independiente	Suelo de Bosque Altoandino.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Color</li> <li>- pH</li> <li>- Conductividad</li> <li>- Concentración de micronutrientes</li> </ul>
Dependiente	<p>Rizobacterias con capacidad fijadora de nitrógeno.</p> <p>Especies vegetales nativas de bosque Altoandino</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- UFC</li> <li>- Cuantificación de AIA (ug/mL)</li> <li>- Cuantificación de ion amonio (ug/mL)</li> <li>- Características macroscópicas</li> <li>- Características microscópicas</li> <li>Clasificación: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gram negativas</li> <li>- Gram positivas</li> </ul> </li> <li>- Altura de la planta</li> <li>- Número de hojas</li> <li>- Grosor del tallo</li> </ul>

#### 5.4 FASE I. DETERMINACIÓN DE RIZOBACTERIAS CON CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO

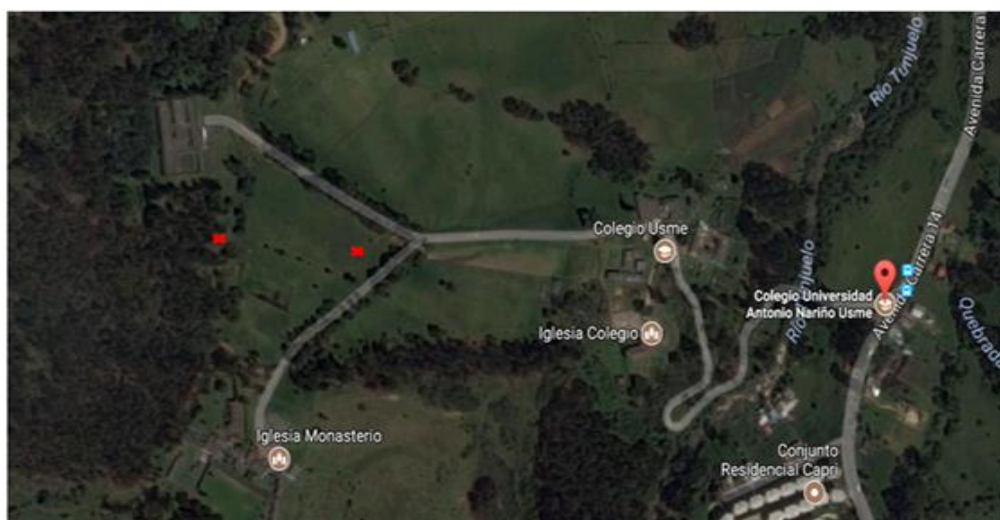
##### 5.4.1 Recolección de muestras y preparación

El presente trabajo de investigación se realizó en el parque eco tecnológico de la Universidad Antonio Nariño ubicado en la sede de Usme en el Km 15 16 - 71 Sur vía Usme Bogotá, Colombia, con coordenadas 4° 28' 58.6812" y -74° 7' 27.7464" (Figura 18). La fauna, flora y características de este lugar concuerdan con las del corredor Norandino.

Se recolectaron 2 muestras de suelo de la zona de restauración, una muestra fue tomada de un área sin cobertura vegetal y la otra de un área conservada en la que perduran especies vegetales nativas del bosque Altoandino de Usme (Figura 18). El muestreo se realizó mediante la técnica en zig zag, tomando cinco submuestras y mezclándolas para obtener la muestra final (36); cada una de 100g tomada a una profundidad de 20 cm, donde generalmente se encuentra la mayor concentración de raíces en el suelo (37). Posteriormente, se transportaron dichas muestras en condiciones de refrigeración hasta el laboratorio, donde se

realizaron diluciones seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  utilizando 10 g de cada muestra (7).

Figura 18. Ubicación geográfica de la zona de muestreo, perteneciente al corredor Chingaza – Sumapaz, parque eco tecnológico de la Universidad Antonio Nariño, ubicado en la sede de Usme en el Km 15 16 - 71 Sur vía Usme Bogotá, Colombia. Tomado de Google maps.



#### 5.4.2 Aislamiento en medios selectivos para rizobacterias fijadoras de nitrógeno

Las diluciones se sembraron por duplicado en los medios selectivos para rizobacterias fijadoras de nitrógeno, ASHBY, NFB y JMV (cuyas formulaciones fueron suministradas por la Universidad Antonio Nariño, Bogotá Colombia, ver Anexo 1 ) tomando 0.1 mL de cada una. Los medios NFB y JMV se incubaron durante 15 días a 30°C y el medio ASHBY se incubó durante 8 días a 30°C. Pasado el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias morfológicamente diferentes y se purificaron en los medios de los cuales se aislaron, incubando de nuevo en las condiciones iniciales (5).

Tanto en aislamiento como en purificación se realizó descripción macroscópica y microscópica de las colonias mediante tinción de Gram, con su respectivo registro fotográfico. Adicionalmente se realizaron pruebas bioquímicas catalasa y oxidasa a las colonias purificadas.

Por otra parte, se hicieron controles positivos y negativos de cada medio para confirmar la productividad y esterilidad de los mismos. Como control positivo se usó un bioinóculo comercial, compuesto por *Azotobacter* sp., *Lactobacillus* y

*Pseudomonas* sp., y un control negativo sin ningún tipo de inóculo. Los medios control se trataron en las mismas condiciones descritas para el ensayo con las diluciones del suelo en estudio.

Todas las colonias aisladas se almacenaron mediante Criopreservación a -70°C para garantizar su disponibilidad en futuras investigaciones.

## 5.5 FASE II. SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS CON MAYOR POTENCIAL FIJADOR DE NITRÓGENO *IN VITRO*.

Se realizaron ensayos colorimétricos para determinación *in vitro* de producción de ion amonio y AIA, con el fin de seleccionar las rizobacterias con mayor potencial de fijación de nitrógeno y promoción de crecimiento vegetal, respectivamente. Estos ensayos se realizaron por triplicado para garantizar la confiabilidad y reproducibilidad de los datos. Adicionalmente, se usó como control positivo para los dos ensayos una cepa descrita como *Azotobacter* sp.

### 5.5.1 Cuantificación de ácido indol acético (AIA)

Para evaluar la producción *in vitro* de AIA, se usó el método colorimétrico de Salkowski modificado (38,39). Como se observa en la Tabla 3, se probaron dos formulaciones del reactivo para determinar la mayor sensibilidad en la detección de AIA.

Tabla 3. Formulaciones de Reactivo Salkowski evaluadas en el ensayo (39).

Reactivo Salkowski (100mL)			
Formulación 1		Formulación 2	
HClO <sub>4</sub>	36mL	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	43mL
FeCl <sub>3</sub>	57mL	FeCl <sub>3</sub>	57mL
Agua destilada	Aforar	Agua destilada	Aforar

Una vez seleccionado el reactivo más sensible, se realizó la curva de calibración con un patrón de ácido 3-indolacético de la casa comercial Alfa Aesar. La concentración inicial de este patrón fue de 100ug/mL, a partir del cual se obtuvieron diferentes concentraciones (0, 2, 4, 6, 8, 10,15, 20, 30, 40 ug/mL) de



acuerdo a la producción de AIA reportada para rizobacterias. La relación patrón reactivo fue 1:2, usando 1mL de cada patrón y 2mL de reactivo. La reacción colorimétrica se evidenció pasados 30 minutos en condiciones de oscuridad, a temperatura ambiente, por la aparición de un color rosado a fucsia y la absorbancia fue leída a 530 nm en espectrofotómetro JENWAY 6320D. (38, 39). La gráfica de dicha curva se obtuvo mediante regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2013.

Para determinar la producción de AIA de las bacterias en estudio, se ajustó un inóculo de cada colonia a una densidad óptica de 0.20 absorbancias a 600nm en solución salina 0,85%. A continuación se adicionaron 100uL de cada inóculo en tubos con caldo Trypticase soya suplementado con triptófano y se incubaron a 37° en agitación constante a 150rpm durante 72 horas en condiciones de oscuridad para evitar degradación del AIA. Pasado el periodo de incubación se centrifugaron los tubos, se tomó 1mL de sobrenadante y 2mL de reactivo Salkowski para generar la reacción en las mismas condiciones de la curva de calibración y estimar la concentración de AIA producida por cada colonia. Para la aplicación del siguiente ensayo, se seleccionaron las 10 bacterias con mayor producción de AIA.

#### 5.5.2 Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

La cuantificación del nitrógeno fijado se realizó mediante la detección del ión amonio según el método colorimétrico fenol hipoclorito de Berthelot (16). Inicialmente se realizó la curva de calibración a partir de un patrón de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) 100 ug/mL, el cual se diluyó hasta obtener las concentraciones 0, 2, 4, 6, 8, 10 ug/mL rango que corresponde a la producción del ión amonio *in vitro*, por parte de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno. A cada patrón se le agregó 0.4mL de solución alcohólica de fenol al 10%, 0.4 mL de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 1mL de solución oxidante. Todo esto se mezcló y se dejó en reposo durante una hora para generar la reacción que se evidenció por la aparición de una coloración de verde azul a azul intenso, según la concentración de amonio (40). Por último, se leyó la absorbancia de cada patrón a 632nm. La gráfica de dicha curva se obtuvo mediante regresión lineal en el

programa Microsoft Excel 2013.

Una vez realizada la curva de calibración se inició la medición en las bacterias. Cada colonia se inoculó en tubos con 5mL de caldo extracto de suelo al 10% y se incubaron a 30°C durante 72 horas en agitación constante a 150 rpm. Pasado este tiempo, se agregó a cada tubo 15 mL de KCl 2M en condiciones de esterilidad, dejando en agitación 1 hora y en reposo otra hora. Del sobrenadante se tomaron 10mL y se centrifugaron por 20 min a 2000 rpm para separar el sobrenadante, que se usó para generar la reacción en las mismas condiciones en que se realizó la curva de calibración. Las 5 colonias que presentaron mayor producción de amonio fueron seleccionadas para la producción de los bioinóculos simples que se usaron en el ensayo en vivero.

### 5.5.3 Identificación presuntiva de rizobacterias fijadoras de nitrógeno

Se aplicó el panel de pruebas bioquímicas Entérico / No fermentador del Sistema de identificación BBL Crystal ID a cada una de las rizobacterias usadas en la producción de los bioinóculos, con el fin de obtener una aproximación a la identificación de las rizobacterias. La selección de este panel se realizó teniendo en cuenta las características microscópicas que estas presentaron.

## 5.6 FASE III. ESTABLECIMIENTO DEL APORTE DE LAS BACTERIAS AL CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES VEGETALES.

### 5.6.1 Preparación de bioinóculos

Las 5 colonias seleccionadas se activaron mediante la inoculación en 10mL de caldo Tripticasa soya durante 24 horas a 37°C. Pasado el periodo de incubación se ajustaron a escala 0,5 McFarland, con la intención de obtener la misma cantidad de masa microbiana. Seguidamente, se realizaron controles de pureza y viabilidad mediante la siembra de 100uL de cada bioinóculo en los medios solidos específicos de los aisló cada rizobacteria (ASHBY y JMV). Posteriormente se sembraron los inóculos ajustados en 200mL de los caldos específicos. A continuación se dejaron en agitación constante a 150rpm a 37°C,

realizando mediciones de la biomasa a diferentes intervalos de tiempo hasta alcanzar la estabilidad del crecimiento bacteriano (fase estacionaria). Una vez logrado esto, se retiraron de incubación, se realizó de nuevo control de pureza y viabilidad y se refrigeraron hasta el momento de la inoculación en vivero. El número de UFC de cada inóculo se determinó mediante el método de conteo en placa. Para esto se tomaron 100uL de las diluciones del inóculo realizadas (102, 103, 104, 105 y 106) y se sembraron en los medios específicos sólidos de los cuales se aislaron inicialmente (39).

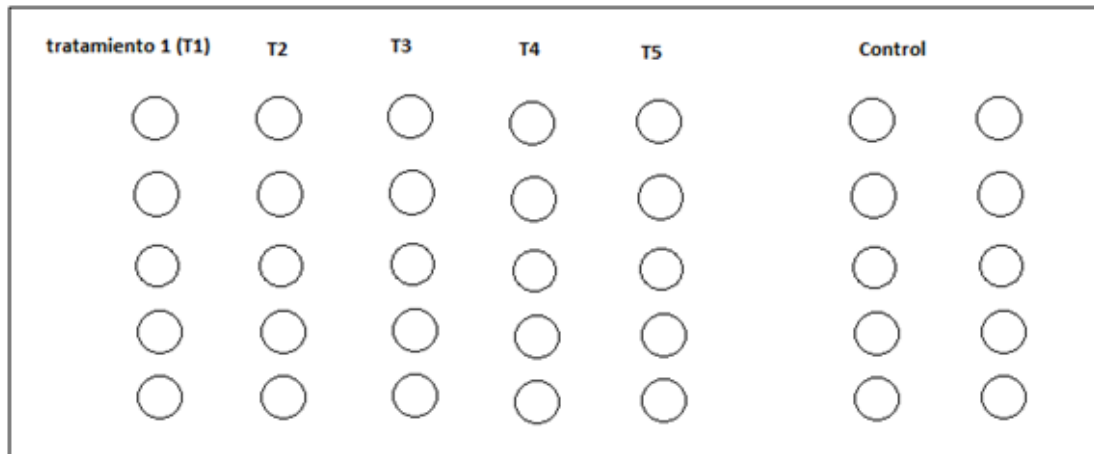
### 5.6.2 Ensayos de crecimiento vegetal

Para evaluar el aporte de las rizobacterias seleccionadas al crecimiento y adaptación de especies nativas del bosque Altoandino, se realizaron ensayos en el vivero de la sede Usme de la Universidad Antonio Nariño, con plantas anteriormente usadas en restauración ecológica como especies sucesionales tempranas, que ayudan a formar núcleos de regeneración y que han desarrollado alta capacidad de adaptación y supervivencia en zonas de alta montaña. Las especies usadas fueron *Escallonia paniculata* y *Vallea stipularis*, las cuales se cultivaron en vivero 1 mes antes de iniciar los procesos experimentales (3).

Cada colonia corresponde a un tratamiento; se aplicaron 5 tratamientos, cada uno a 5 plantas de las dos especies para un total de 25 plantas por especie vegetal. Adicionalmente se tomaron 10 plantas por especie como control, a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento bacteriano, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los ensayos y el control.

La aplicación de los tratamientos se realizó una sola vez al inicio del experimento adicionando 20mL de inóculo a cada planta.

Figura 19. Representación gráfica del experimento en vivero por especie. Elaborado por los autores, 2017.



Con la intención de evaluar el efecto de los inóculos microbianos simples sobre el crecimiento de la planta, se midieron las variables: largo del tallo (altura) desde la base de la planta hasta la hoja apical (cm), número de hojas y diámetro del tallo (cm). Antes de aplicar los tratamientos se realizaron estas medidas como diagnóstico inicial (Tiempo 0) y los muestreos se hicieron durante 3 meses, realizando mediciones de las plantas cada 15 días, (Tiempo 1 – 15 días, Tiempo 2 – 30 días, Tiempo 3 – 45 días, Tiempo 4 – 60 días, Tiempo 5 – 75 días, Tiempo 6 – 90 días).

Adicionalmente, con el objeto de hacer una evaluación cualitativa del establecimiento de las rizobacterias inoculadas en el suelo de las plantas en vivero, se tomaron muestras cada 30 días (tiempos 2, 4 y 6) de 100 g de suelo de plantas elegidas al azar. Se tomó una muestra correspondiente a los controles de las dos especies vegetales y dos más correspondientes a plantas de los dos tratamientos que evidenciaron mayor potencial en el momento del primer muestreo. Dichas muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio donde se procesaron de la misma manera que las muestras iniciales realizando diluciones seriadas y posterior siembra en medios específicos.

### 5.6.3 Análisis estadístico

Se evaluó la homogeneidad y repetibilidad de los datos obtenidos en los

ensayos *in vitro*, mediante el análisis de la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Adicionalmente, se realizó el tratamiento de los datos obtenidos en el ensayo de vivero mediante el análisis de varianza (ANOVA) con el programa *Statistica release 7 statsoft 2007* para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

## 6. RESULTADOS

Las dos muestras de suelo recolectadas de la zona de restauración (Figura 18), una de ellas de un área sin cobertura vegetal y la otra con cobertura vegetal, presentaron las características fisicoquímicas registradas en la tabla 4.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de los suelos analizados (37).

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS	MUESTRA 1 SIN COBERTURA VEGETAL	MUESTRA 2 CON COBERTURA VEGETAL	VALORES EN SUELO FERTIL
Color	Negro	Negro	-
Textura	Franco	Franco	-
pH	5.3	6.1	6.5 – 7.5
Conductividad	6.92 dS/m	2.31 dS/m	2 – 4 dS/m
Concentración de NO <sub>3</sub> – N	8.00 ppm	8.75 ppm	126 – 504 ppm
Concentración de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	36.30 mg/L	5.78 mg/L	35 – 70 mg/L
Concentración de K	285 mg/L	260 mg/L	150 – 300 mg/L
Concentración de Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup>	~450 mg/L	0 mg/L	250 – 670 ppm

Los valores obtenidos para cada suelo presentan similitud en la mayoría de los parámetros, no obstante, se observan notables diferencias en la conductividad, la concentración de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y la concentración de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.

### 6.1 AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS PARA RIZOBACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

Se aisló un total de treinta y tres rizobacterias fijadoras de nitrógeno de las dos muestras de suelo analizadas. A cada colonia se le asignó el código “RBFN” (Rizobacterias Fijadoras de Nitrógeno). Nueve corresponden a la muestra 1 (suelo sin cobertura vegetal) y veinticuatro a la muestra 2 (suelo con cobertura vegetal). Del total de aislamientos, el 21% son bacilos Gram positivos y el 79% bacilos Gram negativos. A partir del medio JMV se aislaron 10 colonias, del medio ASHBY 11 colonias y del medio NFB 12 colonias. Ver Figura 20.

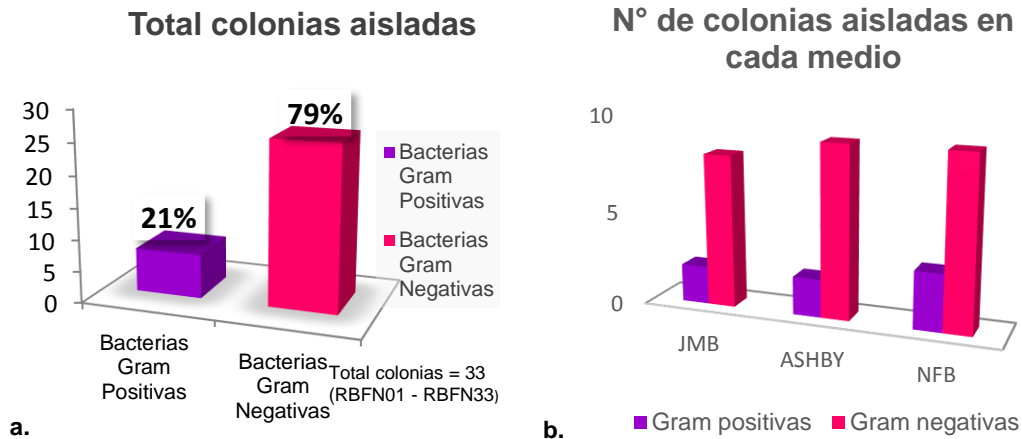

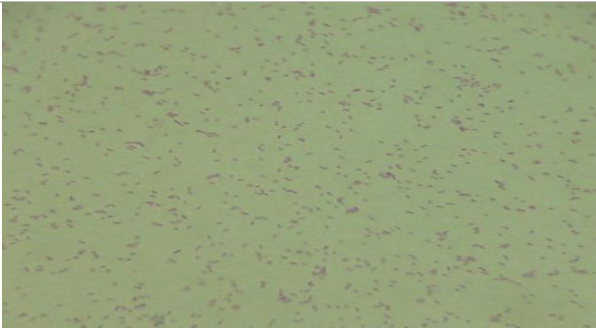

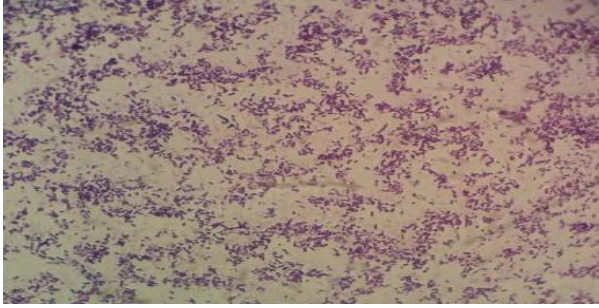

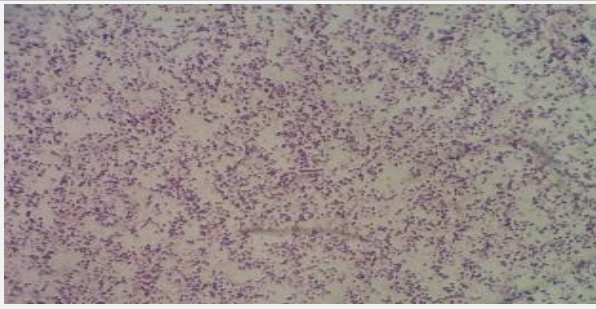




Figura 20. a. Clasificación del total de colonias aisladas según tinción de Gram. b. Numero de colonias aisladas en cada medio. Elaborado por los autores, 2017.

A partir de la muestra 1 (suelo sin cobertura vegetal) se encontró nueve colonias. En el medio Ashby se aislaron dos colonias RBFN 01 y RBFN 02, ambas corresponden a bacilos Gram negativos pero difieren en sus características macroscópicas. En el medio NFB se aislaron las colonias RBFN 03, RBFN 04 y RBFN 05, dos de estas bacilos Gram positivos y una bacilos Gram negativos. Se observó que eran colonias pequeñas y de bordes irregulares. Las colonias RBFN 06, RBFN 07, RBFN 08 y RBFN 09 se aislaron del medio JMV, las tres primeras corresponden a bacilos Gram negativos y la última, bacilos Gram positivos. Macroscópicamente se observaron colonias de diversos tamaños. En la tabla 5 se relaciona cada aislamiento de esta muestra con sus respectivas características macroscópicas, microscópicas y los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

<b>MEDIO DE CULTIVO ASHBY</b>	
<b>RBFN 01</b>	
	
	<p>Colonias pequeñas, blancas, brillantes, cremosas, de bordes irregulares.</p>
<p>Bacilos Gram negativos</p>	
<p>Catalasa: Negativa</p>	
<p>Oxidasa: Negativa</p>	

<b>RBFN 02</b>		
	Colonias medianas, color crema y bordes irregulares.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Negativa	Oxidasa: Negativa
<b>MEDIO DE CULTIVO NFB</b>		
<b>RBFN 03</b>		
	Colonias pequeñas, grises bordes irregulares	Bacilos Gram positivos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Positiva
<b>RBFN 04</b>		
	Crecimiento en forma de velo opaco del color del medio.	Bacilos Gram positivos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Positiva
<b>RBFN 05</b>		
	Colonias muy pequeñas, opacas, bordes irregulares	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Negativa



**MEDIO DE CULTIVO JMB**

**RBFN 06**



Colonias grandes, amarillas, brillantes, de bordes irregulares.

Bacilos Gram negativos

Catalasa: Negativa

Oxidasa: Negativa

**RBFN 07**



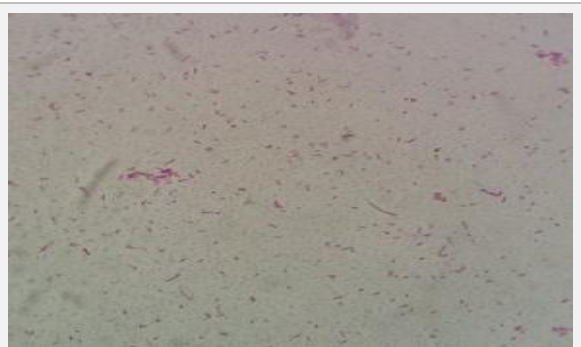
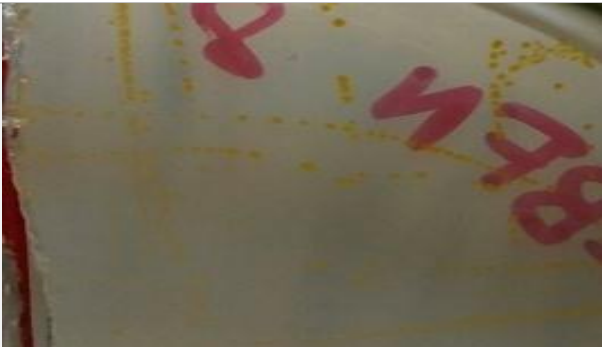
Crecimiento masivo, en forma de velo.

Bacilos Gram negativos

Catalasa: Negativa

Oxidasa: Negativa

**RBFN 08**



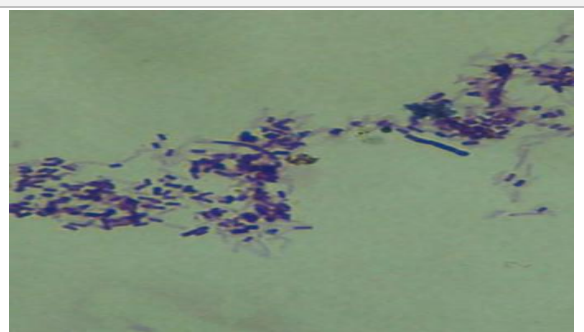
Colonias pequeñas, amarillas, opacas, irregulares.

Bacilos Gram negativos

Catalasa: Negativa

Oxidasa: Negativa

**RBFN 09**



Colonias medianas, amarillas brillantes, irregulares.

Bacilos Gram positivos


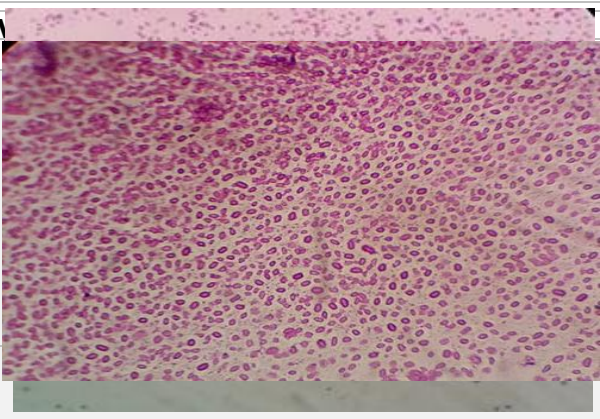

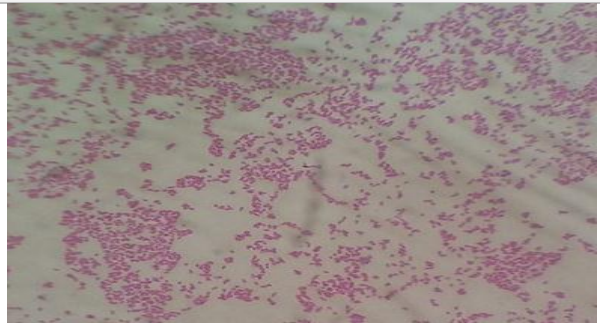


Catalasa: Negativa

Oxidasa: Negativa


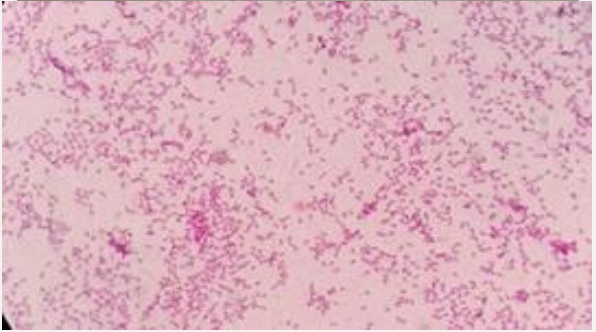

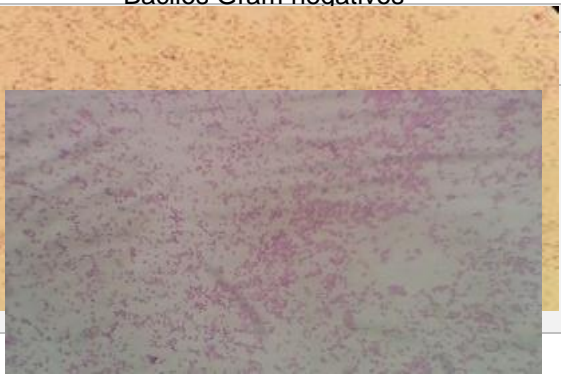

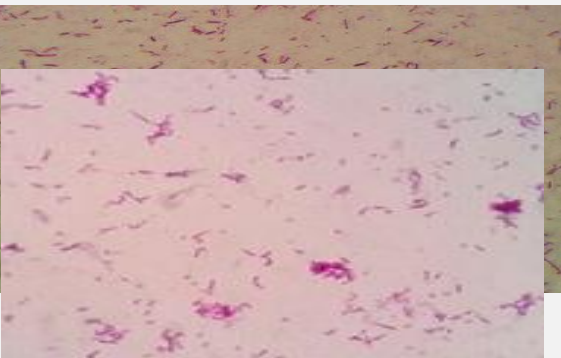

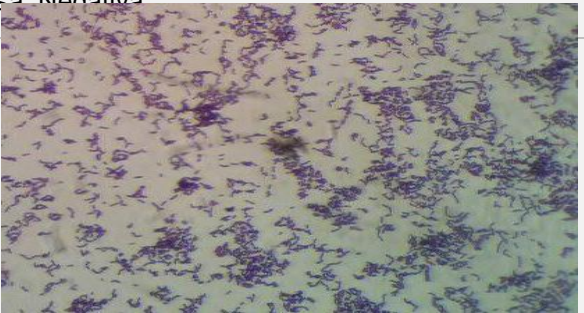
---


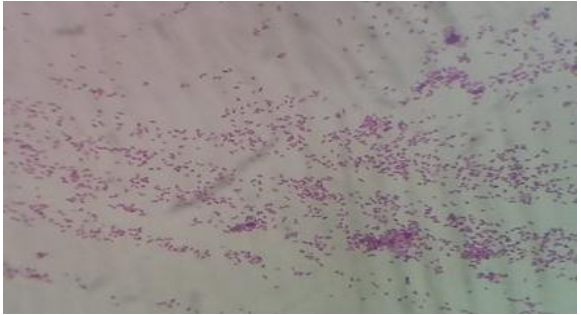



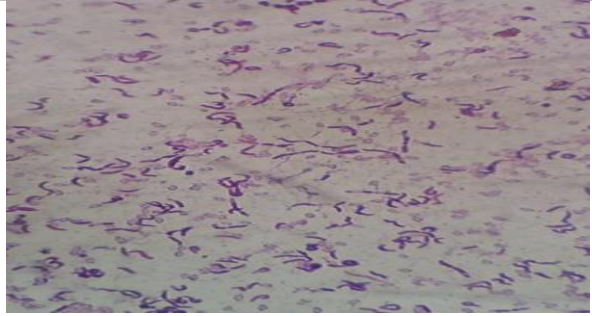

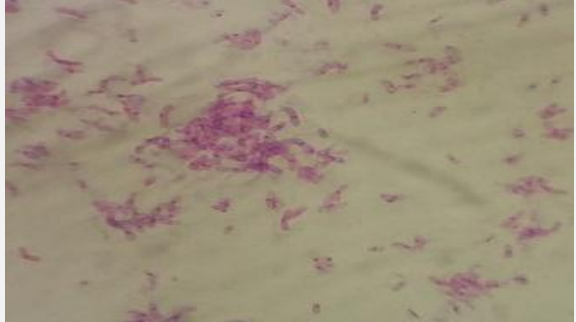
Tabla 5. Descripción macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas de la colonias aisladas a partir de la muestra 1. RBFN: Rizobacteria Fijadora de Nitrógeno. Elaborado por los autores, 2017.


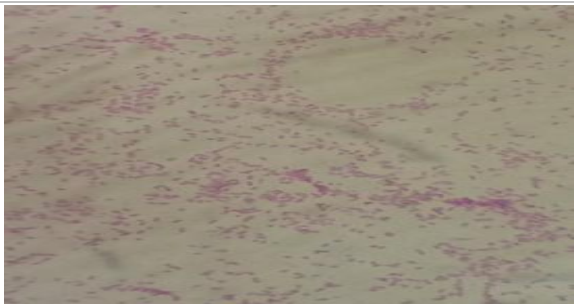

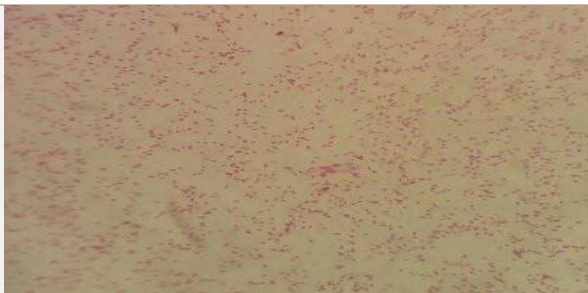

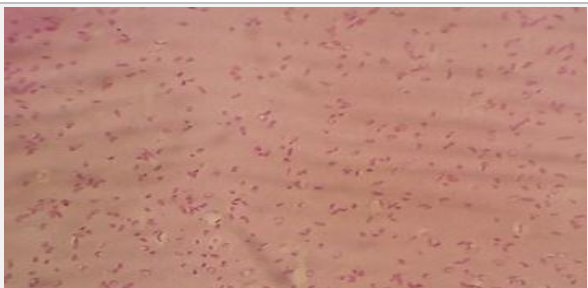


De la muestra 2 que corresponde al suelo con cobertura vegetal, fue posible aislar veinticuatro colonias (RBFN 10 a RBFN 33), de las cuales nueve se obtuvieron a partir del medio Ashby, encontrando variedad en su morfología macroscópica. En este medio se encontraron las colonias más grandes y cremosas, aunque también se aislaron algunas colonias pequeñas y opacas, en cuanto a características microscópicas, predominan los bacilos Gram negativos. En el medio NFB se aislaron nueve colonias, todas de forma bacilar, ocho Gram negativas y una Gram positiva. Es de resaltar la variedad de colores de las colonias encontradas, se observaron colonias verdes, rojizas, naranjas y del color del medio, de tamaño pequeño y mediano y de formas bacilares Gram negativas y Gram positivas. Del medio JMV se aisló el menor número de colonias, se encontraron colonias en su mayoría grandes, brillantes y del color del medio; prevalecen los bacilos Gram negativos. En la tabla 6 se relaciona cada aislamiento de esta muestra con sus respectivas características macroscópicas, microscópicas y los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

<b>RBFN 34</b>		
	Catalasa: Negativa Catalasa: Negativa	Oxidasa: Negativa Oxidasa: Positiva Bacilos Gram positivos
	Colonias medianas, brillantes, transparentes, irregulares.	
Catalasa: Positiva		Oxidasa: Negativa
<b>RBFN 11</b>		
	Colonias grandes, con bordes irregulares.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Positiva
<b>RBFN 12</b>		
	Colonias medianas, cremosas, brillantes, bordes irregulares.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Positiva

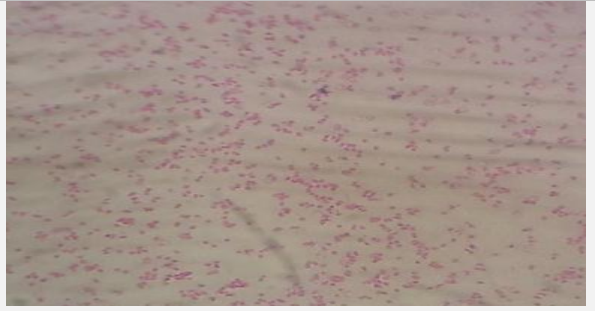
MEDIO DE CULTIVO NFB

<b>RBFN 95</b>		
	Colonias pequeñas rojizas, bordes regulares, opacas.	Bacilos Gram negativos
<b>RBFN 16</b>		
	Irregulares. Colonias pequeñas, translucidas, borde regular, brillantes.	Oxidasa: Negativa Cocobacilos Gram negativos
<b>RBFN 21</b>		
	Colonias pequeñas, secas, borde regular, blancas. Catalasa: Negativa Catalasa: Positiva	Oxidasa: Negativa Bacilos Gram negativos Oxidasa: Negativa
<b>RBFN 18</b>		
	Colonias pequeñas, bordes regulares. Catalasa: Negativa	Bacilos Gram positivos Oxidasa: Positiva

<b>RBFN 22</b>		
	Colonias medianas, verdes, brillantes, bordes irregulares	Cocobacilos Gram negativos
	Catalasa Positiva	Oxidasa: Negativa
<b>RBFN 23</b>		
	Colonias grandes, opacas, bordes irregulares.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Negativa	Oxidasa: Negativa
<b>RBFN 24</b>		
	Colonias pequeñas, bordes irregulares, opacas, secas.	Bacilos Gram positivos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Negativa
<b>RBFN 25</b>		
	Colonias medianas, naranjas, bordes regulares, opacas, secas	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Negativa

<b>RBFN 26</b>		
	Colonia medianas, verde claro, con borde regular, brillantes	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Negativa
<b>RBFN 27</b>		
	Colonias pequeñas, opacas, transparentes, borde irregular.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Negativa	Oxidasa: Negativa
<b>MEDIO DE CULTIVO JMB</b>		
<b>RBFN 28</b>		
	Colonias grandes, cremosas, borde regular, brillantes, aguadas.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Negativa	Oxidasa: Positiva
<b>RBFN 29</b>		
	Colonias grandes, brillantes, bordes irregulares	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Negativa	Oxidasa: Negativa

**RBFN 30**



Colonias medianas, color crema, de borde regular.

Bacilos Gram negativos

Catalasa: Negativa

Oxidasa: Positiva


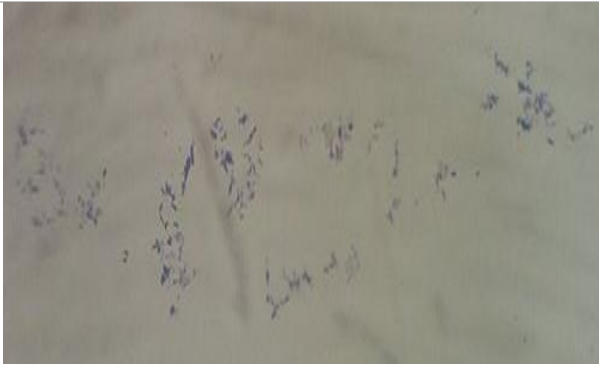

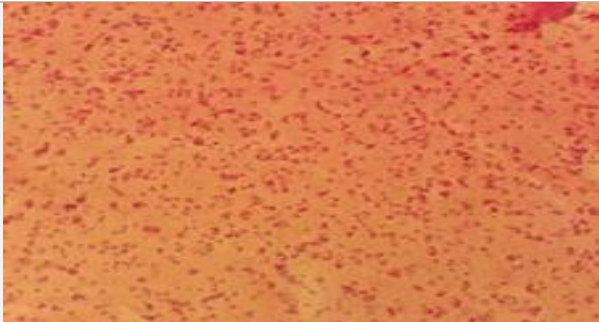

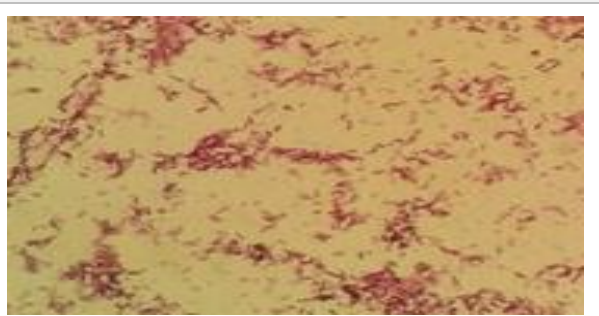
<b>RBFN 31</b>		
	Colonias pequeñas, blancas, cremosas, con bordes regulares.	Bacilos Gram Positivos
	Catalasa: Positiva	Oxidasa: Negativa
<b>RBFN 32</b>		
	Colonias medianas, brillantes, cremosas.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Negativa	Oxidasa: Positiva
<b>RBFN 33</b>		
	Colonias grandes, naranjas, bordes irregulares.	Bacilos Gram negativos
	Catalasa: Negativa	Oxidasa: Negativa

Tabla N°6. Descripción macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas de la colonias aisladas a partir de la muestra 2. RBFN: Rizobacteria Fijadora de Nitrógeno. Elaborado por los autores, 2017.

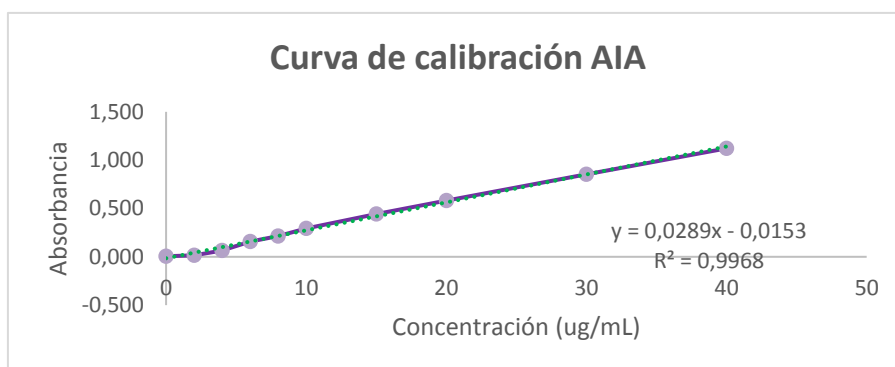
La Criopreservación de las colonias se registró usando el formato de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA). Ver tabla en Anexo 2.



## 6.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

Los valores de la producción de AIA por parte de las rizobacterias fueron calculados a partir de la curva patrón, obtenida mediante regresión lineal cuya ecuación equivale a  $y=0.0289x - 0.0153$ , con un valor de  $R^2 = 0.9968$  que indica que la ecuación puede ser usada para determinar las concentraciones. (Figura 21). Ver tabla de absorbancias en anexo 3.

Figura 21. Curva de calibración a partir de Ácido Indol Acético comercial. Elaborado por los autores, 2017.



El rango de producción de AIA por las rizobacterias del ensayo estuvo entre 3.37 y 11.87 ug/mL. En la figura 22 se observa la reacción colorimétrica obtenida por cada colonia. Las 10 colonias que presentaron mayor producción de esta fitohormona corresponden a las RBFN 6, 13, 14, 16, 24, 25, 28, 29, 30 y 32 (Tabla 7), las cuales se seleccionaron para realizar los ensayos de cuantificación del ion amonio. El rango de producción de las 10 colonias mencionadas estuvo entre 4.69 y 11.87 ug/mL.

Figura 22. Reacción colorimétrica de producción de AIA por las rizobacterias. Fotografía tomada por los autores, 2017.



En la siguiente tabla se muestra la concentración de AIA producida por cada colonia. El promedio de las concentraciones se obtuvo a partir de las tres mediciones realizadas a cada colonia. La desviación estándar obtenida para cada una indica que los datos están concentrados alrededor de la media. Por su parte, el coeficiente de variación menor al 10% evidencia que hubo repetibilidad en el procedimiento realizado, validando así la confiabilidad de la tendencia y la homogeneidad de los resultados.

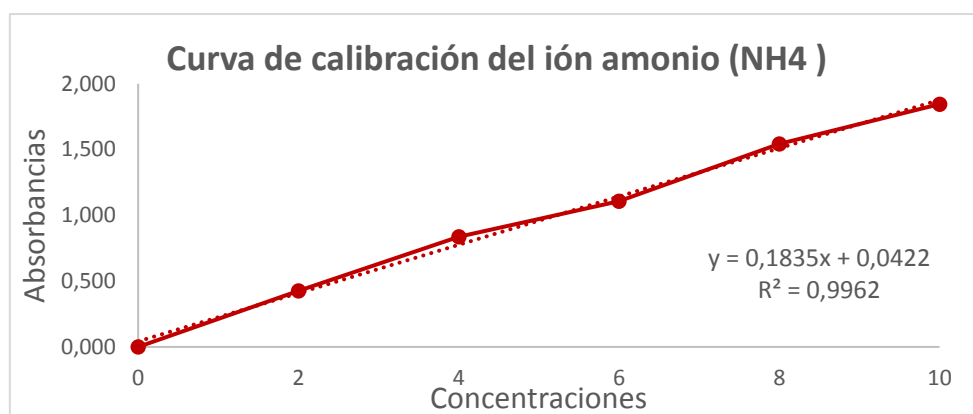
Tabla N° 7 Producción de AIA de las rizobacterias aisladas. Elaborado por los autores, 2017.

Colonia (RBFN)	Concentración promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
1	5,596	0,195	3,481
2	4,323	0,126	2,918
3	5,535	0,273	4,814
4	4,889	0,245	5,010
5	5,010	0,345	6,879
6	11,872	0,275	2,314
8	4,354	0,144	3,302
9	3,798	0,185	4,875
11	4,828	0,305	6,318
13	6,038	0,174	2,882
14	5,380	0,084	1,411
15	5,785	0,139	2,400
16	6,722	0,342	5,095
17	4,038	0,037	0,905
18	4,494	0,074	1,651
19	4,696	0,130	2,288
21	4,364	0,153	3,495
22	3,596	0,216	6,007
23	3,980	0,130	3,264
24	5,987	0,115	1,918
25	5,677	0,060	1,274
26	5,038	0,125	2,479
27	3,374	0,222	6,569
28	6,367	0,397	6,241
29	7,801	0,243	3,115
30	10,148	0,056	0,555
31	4,747	0,051	1,071
32	5,960	0,053	0,980
33	4,494	0,092	2,038

### 6.3 CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO FIJADO *IN VITRO* (PRODUCCIÓN DE IÓN AMONIO)

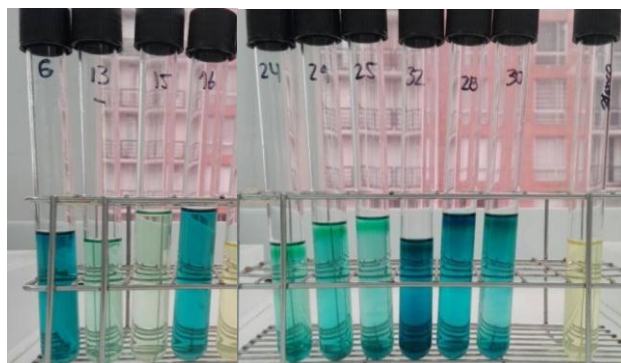
Los valores de producción del ion amonio por parte de las rizobacterias fueron calculados a partir de la curva patrón, cuya ecuación equivale a  $y = 0,1835x + 0,0422$ , con un valor de  $R^2 = 0.9962$  que indica que la ecuación es confiable para hallar las concentraciones. (Figura 23). Ver tabla de absorbancias en anexo 4.

Figura 23. Curva de calibración a partir de un patrón de cloruro de amonio. ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Elaborado por los autores, 2017.



El rango de producción del ión amonio por las rizobacterias del ensayo, estuvo entre 0.37 y 7.99  $\mu\text{g/mL}$ . En la figura 24, se observa la reacción colorimétrica de cada colonia. Las 5 colonias que presentaron mayor concentración de este ión fueron las RBFN 6, 16, 28, 30 y 32 (Tabla 8). Estas se seleccionaron para preparar los bioinóculos utilizados en el ensayo de crecimiento vegetal en vivero. La colonia que presentó mayor concentración fue la RBFN 32 con 7,99  $\mu\text{g/mL}$  y la menor producción fue la RBFN 16 con 3,44  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 24. Reacción colorimétrica de producción de ión amonio por las rizobacterias. Fotografía tomada por los autores, 2017.



En la tabla 8 se muestra la concentración de ión amonio producida por cada

colonia. El promedio de las concentraciones se obtuvo a partir de las tres mediciones realizadas a cada colonia. La desviación estándar obtenida indica que no hay dispersión de los datos. Por otra parte, el coeficiente de variación menor al 10% en cada colonia evidencia que hubo repetibilidad en el procedimiento realizado.




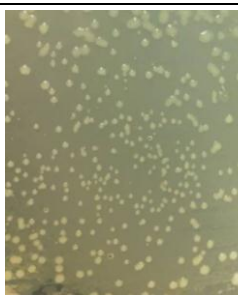

Tabla N° 8. Producción de ión amonio por parte de las rizobacterias seleccionadas. Elaborado por los autores, 2017.

Colonia (RBFN)	Concentración promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
6	5,439	0,022	0,402
13	0,894	0,022	2,427
15	0,373	0,010	2,564
16	3,436	0,031	0,912
24	2,322	0,019	0,817
25	1,684	0,049	2,929
28	6,850	0,027	0,389
29	2,308	0,016	0,714
30	4,314	0,015	0,338
32	7,991	0,013	0,163

#### 6.4 PREPARACIÓN DE BIOINÓCULOS

Una vez terminado el tiempo de incubación en los medios específicos, se obtuvo el conteo de UFC/mL para cada inóculo previamente ajustado a escala 0,5 Farland. En la dilución 10<sup>5</sup> fue posible realizar el conteo de colonias encontrando 130, 160, 156, 144 y 125 UFC por placa, para cada tratamiento, como se observa en la Tabla 9.

Tabla 9. Conteo de UFC de cada bioinóculo. Elaborado por los autores, 2017.

				
<b>RBFN 6</b> Tratamiento 1 1.3 X 10 <sup>8</sup> UFC	<b>RBFN 16</b> Tratamiento 2 1.6 X 10 <sup>8</sup> UFC	<b>RBFN 28</b> Tratamiento 3 1.56 X 10 <sup>8</sup> UFC	<b>RBFN 30</b> Tratamiento 4 1.44 X 10 <sup>8</sup> UFC	<b>RBFN 32</b> Tratamiento 5 1.25 X 10 <sup>8</sup> UFC

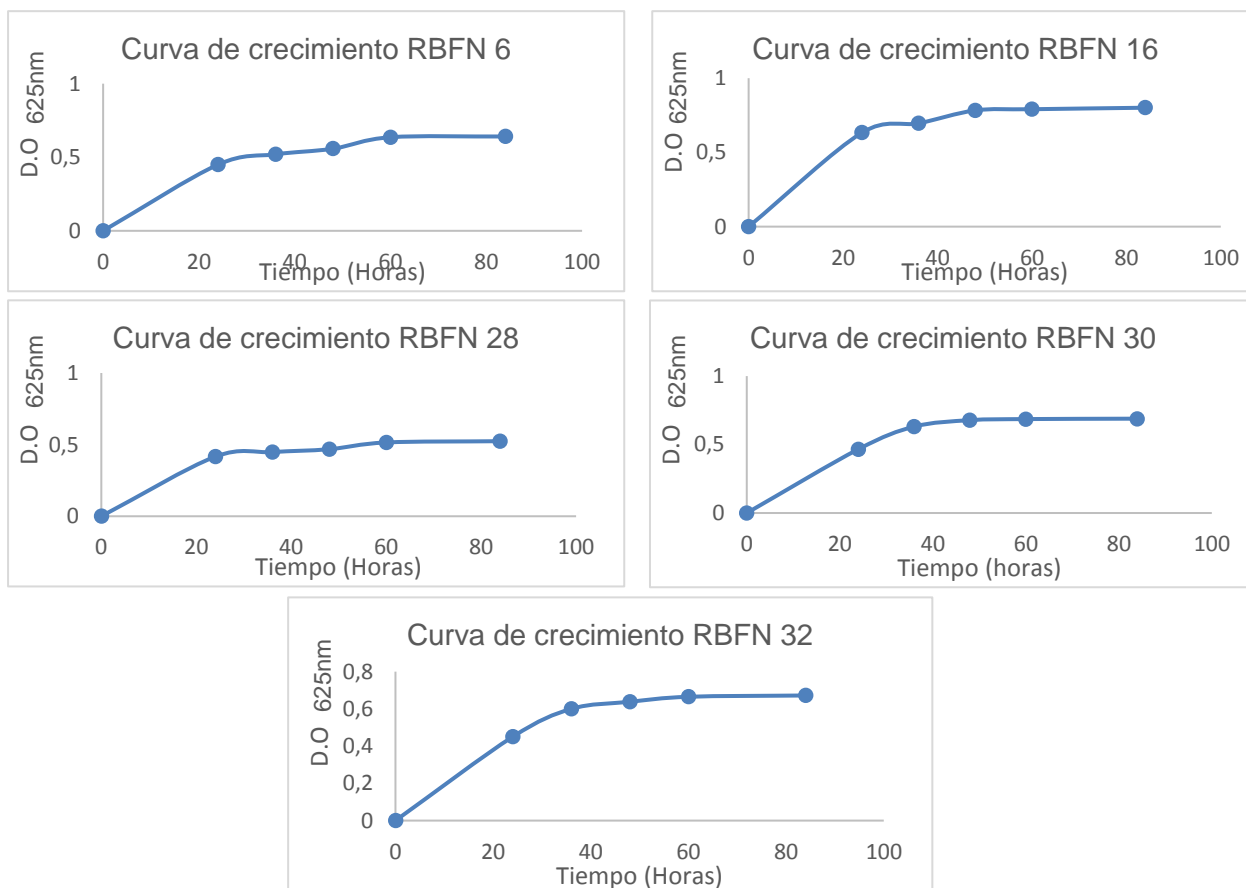
Se presentan los inóculos de cada colonia sembrados en los caldos específicos (Figura 25) y la curva de crecimiento de cada uno.

Figura 25. Preparación e incubación de bioinóculos. Fotografía tomada por los autores, 2017



Como se observa en las curvas de crecimiento (Figura 26) las rizobacterias se encontraban en fase exponencial, la cual representa un estado ideal para su uso, debido a que es allí donde hay mayor producción de metabolitos. (Ver medición de densidad óptica en Anexo 5).

Figura 26. Curvas de crecimiento bioinóculos. Elaborada por los autores 2017.



## 6.5 IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE RIZOBACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

La identificación presuntiva obtenida por medio del panel bioquímico BBL Crystal E/NF se presenta en la tabla 10. (Anexo 6).

Tabla 10. Identificación de las rizobacterias seleccionadas por medio del panel BBL Crystal. Elaborado por los autores 2017.

Código	Identificación	% de confianza	Muestra de suelo de origen
RBFN 6	<i>Serratia marcescens</i>	98%	1 – Sin cobertura vegetal
RBFN 16	<i>Serratia liquefaciens</i>	96%	2 – Con cobertura vegetal
RBFN 28	<i>Enterobacter cloacae</i>	71%	2 – Con cobertura vegetal
RBFN 30	<i>Enterobacter sakazakii</i>	66%	2 – Con cobertura vegetal
RBFN 32	<i>Klebsiella oxytoca</i>	87%	2 – Con cobertura vegetal

## 6.6 ENSAYOS DE CRECIMIENTO VEGETAL



Se evaluó el efecto de los cinco tratamientos durante tres meses mediante la medición de parámetros de crecimiento vegetal (altura, número de hojas y grosor) en 70 plantas de dos especies nativas de Bosque Altoandino, 35 de *Escallonia paniculata* y 35 de *Vallea stipularis*. En la Figura 27 se presenta el orden de las plantas en vivero, ubicadas en dos bloques. Al lado izquierdo 27(a) se observa el bloque de plantas de *Escallonia paniculata*, las primeras filas (de abajo hacia arriba) corresponden a las cinco plantas de cada tratamiento y las últimas dos filas corresponden a las 10 plantas control. Las plantas de la especie *Vallea stipularis* se encuentran ubicadas de la misma manera 27(b)









Figura 27. Especies vegetales en vivero. a. *Escallonia paniculata* b. *Vallea stipularis*. Fotografía tomada por los autores, 2017



En la tabla 11 se muestra el crecimiento progresivo de las plantas a lo largo del tiempo de evaluación. En cada medición fue posible observar que el crecimiento de las plantas de *Escallonia paniculata* en general fue mayor que el de *Vallea stipularis*. Adicionalmente se notó en los diferentes tiempos de estudio, que algunas de las plantas inoculadas con los tratamientos superaban los valores obtenidos en las plantas control (Ver tablas de mediciones de altura, grosor y número de hojas para cada especie en Anexo 7).

Tabla 11. Registro fotográfico de las dos especies vegetales en vivero durante los tiempos evaluados. Elaborado por los autores, 2017.

Tiempos	<i>Escallonia paniculata</i>	<i>Vallea stipularis</i>
Día 0		

<p>Día 15</p>		
<p>Día 30</p>		
<p>Día 45</p>		
<p>Día 60</p>		





A continuación se muestra el análisis estadístico realizado para cada parámetro evaluado, el cual permitió determinar si hubo diferencias significativas entre las plantas inoculadas con los tratamientos y los controles.

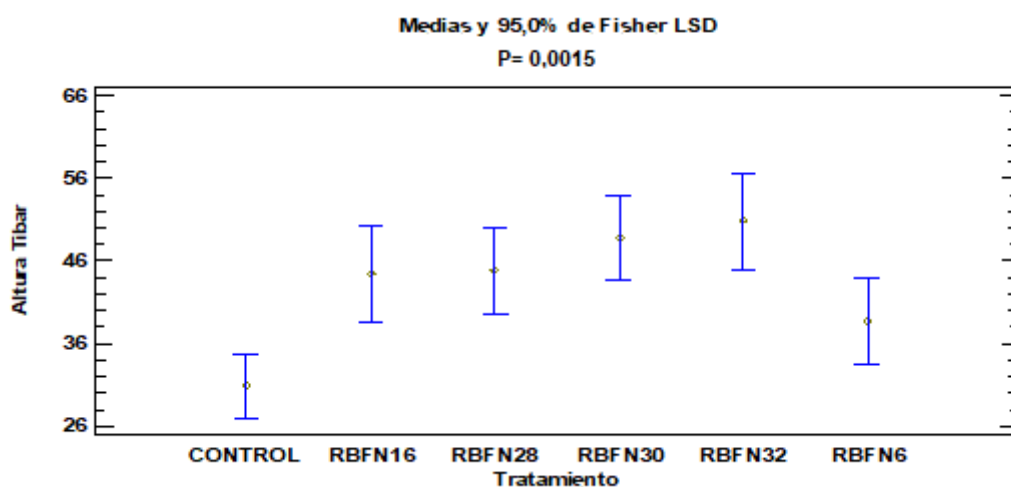
#### 6.6.1 Altura, número de hojas y grosor de *Escallonia paniculata*

Inicialmente, al comparar la altura de cada grupo de plantas según el tratamiento, se observó que no había diferencia entre los tratamientos aplicados y el control ( $p=0,086$ ) lo que hizo pensar que durante el tiempo de seguimiento a las plantas en vivero, los tratamientos no tuvieron un efecto significativo en el crecimiento de la especie vegetal *Escallonia paniculata*.

Sin embargo, al realizar un análisis detallado relacionando la altura con el tratamiento y el tiempo de seguimiento, además de evidenciar el crecimiento progresivo de las plantas, fue posible observar en el día 90 una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre cuatro de los tratamientos (RBFN 16, 28, 30, 32) y

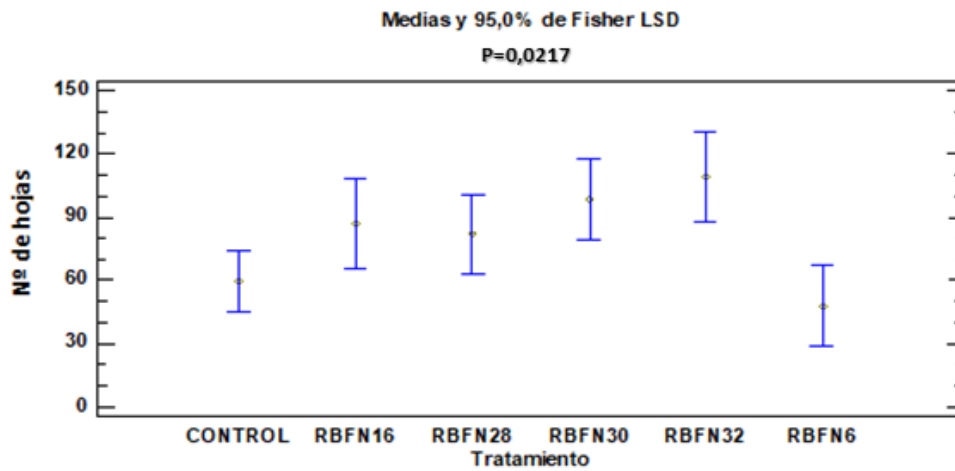
el control. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un análisis de varianza simple con éstos datos, en el que fue posible visualizar que efectivamente si existe diferencia significativa entre la mayoría de tratamientos aplicados, excepto en el de la RBFN 6, como se observa en la Figura 28. Esta diferencia es estadísticamente significativa dado que el valor P de la prueba fue menor a 0,05.

Figura 28. ANOVA simple de los datos de altura al día 90. *Escallonia paniculata*. Elaborado por los autores, 2017.



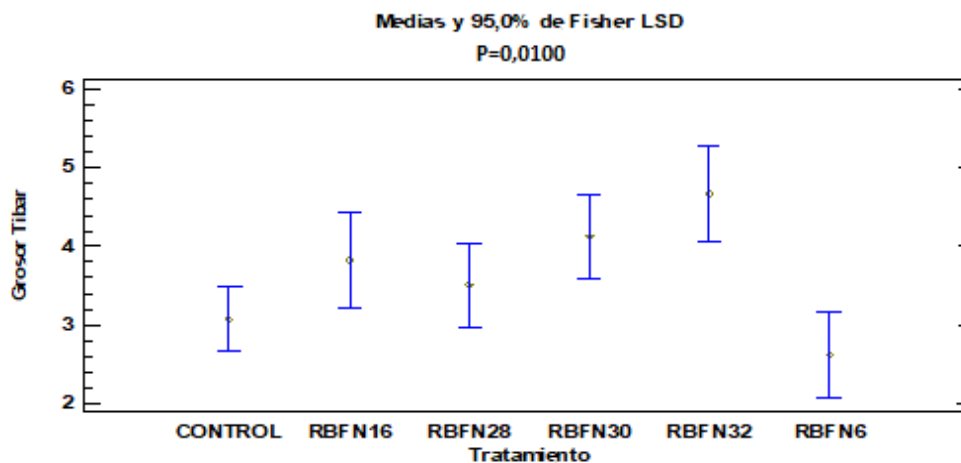
Los parámetros de número de hojas y grosor, presentaron un comportamiento similar al expuesto anteriormente en la altura (Ver anexo 8). En el primer análisis no se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos y control, pero al realizar el análisis de varianza simple con los datos del día 90 se pudo observar que si habían diferencias importantes, ya que en los dos parámetros, se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P= 0,0217$  y  $P= 0,0100$  respectivamente) entre las plantas inoculadas con los tratamientos 4 y 5 (RBFN 30 y 32) y el control, como se puede ver en la figura 29 y 30.

Figura 29. ANOVA simple de los datos de número de hojas en día 90. *Escallonia paniculata*. Elaborado por los autores, 2017.



Además de las diferencias mencionadas, es de resaltar que los tratamientos que tuvieron mayor efecto en el crecimiento de esta especie vegetal fueron el 4 (RBFN 30) y el 5 (RBFN 32), debido a que los valores más altos en los tres parámetros correspondían a las plantas inoculadas con estos tratamientos.

Figura 30. ANOVA simple del grosor en el día 90. *Escallonia paniculata*. Elaborado por los autores, 2017.



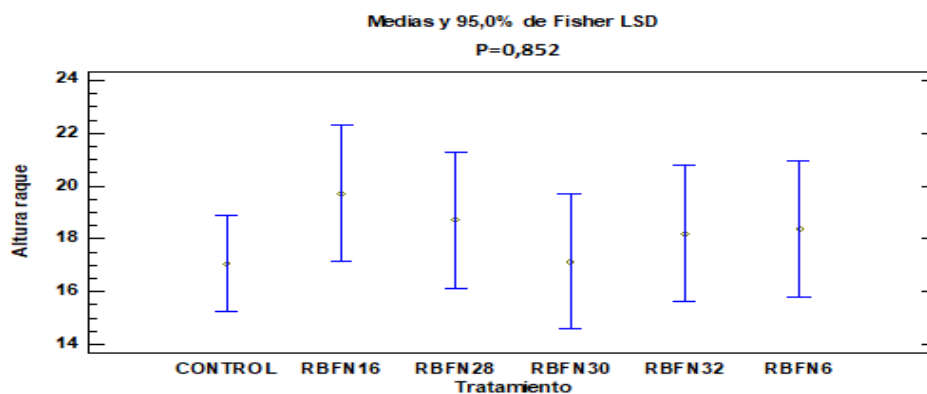
### 6.6.2 Altura, número de hojas y grosor de *Vallea stipularis*

El análisis estadístico realizado para esta especie vegetal demostró que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos y el control en ninguno de los tres parámetros estudiados durante el tiempo de seguimiento ( $P=0,5344$ ).

En la figura 31 se relacionan los datos de altura en el día 90, comparando cada

tratamiento con el control. Además de observar las diferencias, es posible notar que la media de la altura en la mayoría de los grupos de plantas inoculadas es mayor que la media de las plantas sin inóculo (control).

Figura 31. ANOVA simple de la altura de *Vallea stipularis* al día 90. Elaborado por los autores, 2017.



Los análisis de las variables número de hojas y grosor para *Vallea stipularis* mostraron el mismo comportamiento que la altura. Ver anexo 9.

### 6.6.3 Monitoreo cualitativo del establecimiento bacteriano en vivero

A continuación, en las figuras 32, 33 y 34 se presenta el establecimiento de las rizobacterias inoculadas en el suelo de las plantas de vivero:

Figura 32. Registro fotográfico del establecimiento bacteriano 30 días después de la inoculación. Se resaltan en rojo las colonias con características macroscópicas y microscópicas similares a las de los inóculos. Elaborado por los autores, 2017.

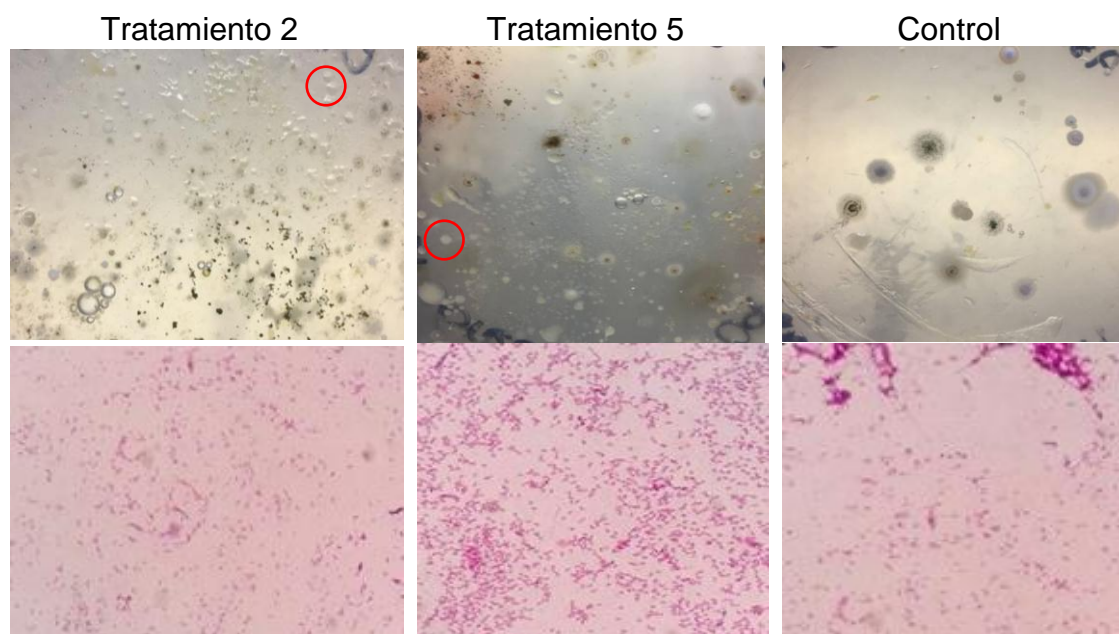


Figura 33. Registro fotográfico del establecimiento bacteriano 60 días después de la inoculación. Se resaltan en rojo las colonias con características macroscópicas y microscópicas similares a las de los inóculos. Elaborado por los autores, 2017.

similares a las de los inóculos. Elaborado por los autores, 2017.

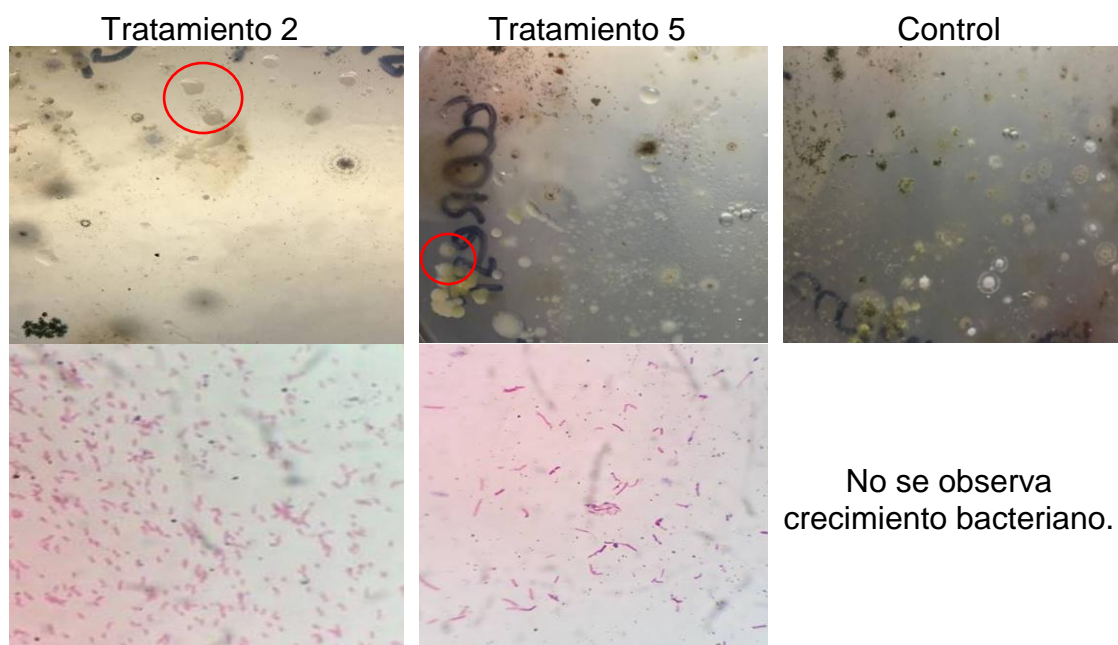
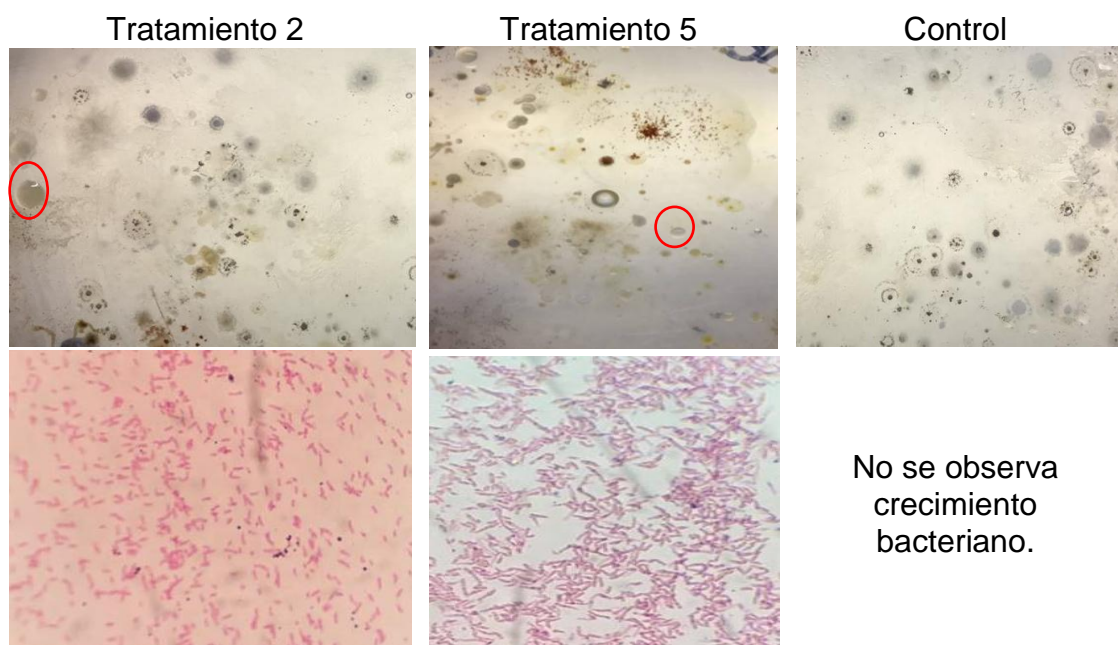


Figura 34. Registro fotográfico del establecimiento bacteriano 90 días después de la inoculación. Se resaltan en rojo las colonias con características macroscópicas y microscópicas similares a las de los inóculos Elaborado por los autores, 2017.



Como se observa en las figuras anteriores, tanto en tratamientos como en controles fue abundante la presencia de hongos. En ninguno de los tratamientos se obtuvo gran cantidad de aislamientos bacterianos. A pesar de esto, en los tres muestreos se encontraron colonias con características similares a aquellas con

las que se realizaron los bioinóculos de cada tratamiento. A dichas colonias se les realizó coloración de Gram, encontrando bacilos Gram negativos. En el caso de las muestras de las plantas sin inóculo (controles), se observó crecimiento bacteriano únicamente en el primer muestreo, posiblemente porque la abundancia de hongos no permitió su crecimiento.

A pesar de que el monitoreo del establecimiento bacteriano fue de carácter cualitativo y se pudo comprobar la supervivencia de las rizobacterias inoculadas, es importante resaltar que la cantidad de colonias encontradas es mucho menor que la inoculada.

En general, se puede decir que los resultados obtenidos fueron satisfactorios de acuerdo a los objetivos planteados. Se logró el aislamiento y posterior selección de las mejores rizobacterias y se estableció su aporte al crecimiento de las dos especies vegetales nativas encontrando que para una de estas el aporte fue más significativo.

## 7. DISCUSIÓN

Las características fisicoquímicas de las dos muestras de suelo mostraron valores similares en los diferentes aspectos evaluados, no obstante, parámetros como la conductividad y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  presentan diferencias notables entre las muestras. La conductividad está estrechamente relacionada con la cantidad de sales presentes en el suelo (41), los valores obtenidos en las dos muestras indican que el suelo de la muestra 1 es ligeramente salino ( $> 4$  dS/m) y el suelo de la muestra 2, que tiene cobertura vegetal, es normal ( $< 4$  dS/m), lo que es más favorable para la nutrición de las plantas. Por su parte la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en la muestra de suelo con cobertura vegetal favorece el intercambio catiónico, proceso determinante en el crecimiento de las plantas según la literatura (42). Los dos suelos analizados presentaron pH ácido, sin embargo el pH del suelo con cobertura vegetal fue más cercano a la neutralidad (6.1), lo que concuerda con lo reportado en la literatura, debido a que en estos suelos la concentración de iones es óptima tanto para el crecimiento de las plantas como para el establecimiento de microorganismos rizosféricos (41, 43). Lo anterior se relaciona directamente con la cantidad de rizobacterias aisladas a partir de cada muestra de suelo, ya que se aislaron más rizobacterias en el suelo normal que en el suelo que presentó condiciones de acidez y salinidad.

Los medios selectivos ASHBY, NFB y JMV, los cuales no poseen ningún compuesto nitrogenado y contienen diferentes azúcares (manitol y ácido málico) como fuente de carbono, son ideales para el aislamiento de rizobacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales al no poseer ninguna fuente de este elemento esencial, deben usar el que se encuentra en la micro atmósfera de la caja de Petri (3). Este procedimiento constituye un primer paso hacia la identificación de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno (5). Teniendo en cuenta lo anterior, la primera selección de las rizobacterias a usar en la producción de bioinóculos, se realizó mediante la siembra en dichos medios, encontrando una cantidad considerable de microorganismos en las dos muestras analizadas.

El total de bacterias aisladas fue 33, de las cuales el 79% corresponde a bacilos Gram negativos y el 21% bacilos Gram positivos. Lo anterior se relaciona con las poblaciones bacterianas que se encuentran habitualmente en muestras de suelo, ya que la mayoría de rizobacterias reportadas como fijadoras de nitrógeno corresponden a bacilos Gram negativos (2, 3).

En los aislamientos obtenidos de las dos muestras se encontraron notables diferencias. A partir del suelo de la muestra 2 (con cobertura vegetal) se aisló el 72% del total de rizobacterias, probablemente porque sus características fisicoquímicas fueron más asimilables para estos microorganismos y porque la presencia de cobertura vegetal supone exudados radiculares, determinantes en el establecimiento de estas rizobacterias (44). Es importante resaltar además que para esta muestra, se aislaron más rizobacterias a partir de los medios NFB (pH 6,8) y ASHBY (pH 7,0), probablemente porque éstos presentan un pH similar al de este suelo, lo que pudo favorecer el crecimiento de las bacterias aisladas. Por otra parte, en la muestra 1 (sin cobertura vegetal) el mayor crecimiento se obtuvo en el medio JMV, el cual tiene un pH más ácido (pH 4,5) semejante al de dicha muestra (5).

Algunos microorganismos tienen la capacidad de inducir el crecimiento vegetal directamente o indirectamente. La influencia directa incluye la producción de fitohormonas, como el ácido indol acético (AIA), auxina que controla diversos procesos fisiológicos como la elongación, división celular, diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad (10,35). Dado que uno de los objetivos de éste trabajo fue favorecer el crecimiento y adaptabilidad de las plantas nativas a escala de vivero, se evaluó como segundo criterio de selección la capacidad de estas rizobacterias para producir dicha auxina, siendo esto un aporte adicional a la fijación de nitrógeno.

La producción de AIA se midió por espectrofotometría, para lo cual se realizó una curva patrón con concentraciones de AIA en un rango de 0 a 40 ug/mL, puesto que en la literatura consultada se reportan estas concentraciones de producción de AIA para bacterias promotoras de crecimiento vegetal (38, 39). Todas las rizobacterias aisladas evidenciaron producción de esta auxina dentro del rango mencionado. Sin embargo, se observó que dicha producción en



general no estuvo entre los valores más altos en comparación con las concentraciones reportadas, considerando que Celis y Gallardo (2008), en su estudio de estandarización de métodos de detección de AIA encontraron por el mismo método usado en este trabajo, que el rango de producción de AIA para bacterias promotoras de crecimiento vegetal estuvo entre 0,25 y 47ug/mL. Lo anterior no debe ser considerado un factor limitante para la promoción del crecimiento vegetal, ya que en otros estudios se demostró que bajas concentraciones de esta fitohormona pueden estimular el desarrollo de las plantas (45).

Otro mecanismo directo de inducción de crecimiento vegetal es la fijación biológica de nitrógeno. Aunque ya se tiene claro que las rizobacterias seleccionadas fijan éste elemento, se utilizó la determinación indirecta del ión amonio como último criterio de selección para escoger las rizobacterias con mayor potencial de fijación *in vitro*, puesto que la presencia de este ión es un indicador que confirma la toma del nitrógeno y su posterior conversión a la forma  $\text{NH}_4$  por parte de las rizobacterias (13). En el estudio realizado por Lara (2007), las rizobacterias fijadoras asimbióticas aisladas de la rizósfera de cultivos agrícolas, *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp, presentaron una producción de amonio de 0,90 a 5,17 y 3,14 a 4,67 ug/mL, respectivamente. Teniendo en cuenta lo anterior se puede inferir que las bacterias seleccionadas en este trabajo tienen buena capacidad de fijación *in vitro*, pues presentaron concentraciones entre 3,43 y 7.99 ug/mL (16).

Al realizar la identificación presuntiva de estas bacterias, se observó que los resultados obtenidos son pertinentes, dado que los géneros identificados están involucrados en la promoción de crecimiento vegetal, especialmente en la fijación de nitrógeno, según la literatura revisada. Lo anterior se pudo comprobar igualmente en este estudio, debido a que estas rizobacterias presentaron buena actividad en los ensayos *in vitro*.

En estudios realizados en cultivos de arroz (*Oryza sativa*) y caña de azúcar (*Oryza sativa*) se comprobó mediante ensayos *in vitro*, que *Serratia marcescens* (RBFN6) tiene actividad fijadora de nitrógeno, encontrando que la inoculación

con esta cepa provoca incrementos significativos en la longitud radical y en el peso seco de las raíces de dichas plantas (46, 47).

La identificación de la RBFN16 coincidió con *Serratia liquefaciens* la cual ha sido reportada como promotora de crecimiento vegetal, pero no se encontraron estudios que la relacionen directamente con la fijación de nitrógeno. No obstante, en este estudio demostró su capacidad para producir AIA y amonio (46).

Por su parte, se ha descrito que las bacterias identificadas como *Enterobacter cloacae* (RBFN 28) *Enterobacter sakazakii* (RBFN 30) y *Klebsiella oxytoca* (RBFN 32) cuentan con el material génico y por ende, la enzima necesaria para realizar el proceso de fijación de nitrógeno, por lo cual se incluyen en el conjunto de bacterias diazótrofes con potencial biofertilizante (4).

Uno de los aspectos más importantes de este estudio consistió en establecer el aporte de las bacterias seleccionadas al crecimiento de especies vegetales nativas de Bosque Altoandino. Para lograrlo, inicialmente fue necesaria la preparación de bioinóculos. Un bioinóculo puede elaborarse utilizando un consorcio de diversas especies microbianas, o un solo microorganismo con características especiales (48).

Barreto (2007) y Orozco (2009) realizaron ensayos con especies forestales usando inóculos simples y en consorcio, obteniendo mejores resultados en la estimulación de los diferentes parámetros vegetales con los bioinóculos simples (2, 10). Partiendo de los resultados mencionados, en este trabajo cada una de las rizobacterias seleccionadas fue usada para producir un bioinóculo simple, que se empleó como tratamiento para un grupo de plantas en el ensayo de vivero.

El análisis estadístico del conjunto de datos obtenidos en este ensayo, permitió generar una visión del comportamiento de las rizobacterias inoculadas y el efecto generado en las especies vegetales del estudio. En *Escallonia paniculata* fue posible observar diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en las variables analizadas (altura, número de hojas y grosor) en algunos de los datos correspondientes al último tiempo de muestreo (90 días). Con relación a la altura, las plantas inoculadas con *Serratia liquefaciens* (RBFN16), RBFN 28, *Enterobacter sakazakii* (RBFN 30) y *Klebsiella oxytoca* (RBFN 32) mostraron diferencias

significativas ( $P < 0,05$ ) frente a las plantas sin inocular, permitiendo evidenciar el efecto nutricional que las rizobacterias generaron al fijar nitrógeno (10). En el número de hojas y grosor sólo tuvieron efecto los tratamientos con *Enterobacter sakazakii* (RBFN 30) y *Klebsiella oxytoca* (RBFN 32).

Arguello y Moreno (2014) encontraron que los tratamientos bacterianos favorecieron el crecimiento de las plantas de cacao hasta el día 120 de evaluación. Así mismo, en el estudio de Criollo (2012) sobre inoculación en pasto, las diferencias significativas se presentaron entre los días 100 y 130 posterior a la inoculación (13, 49); algo similar a lo encontrado en este estudio, donde las diferencias de los tratamientos frente al control se empezaron a notar a los 90 días de inoculación con los tratamientos en la especie *Escallonia paniculata*. De lo anterior se puede resaltar que el comportamiento y efecto de las rizobacterias en los ensayos con plantas agrícolas y gramíneas, puede ser similar al de ensayos realizados en especies forestales, como en este caso.

Con respecto a la especie vegetal *Vallea stipularis*, durante el tiempo de seguimiento se observaron diferencias frente a los controles, pero estas no fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en ninguna de las variables analizadas. Cabe considerar que no todos los estudios reportan efectos positivos en el crecimiento vegetal al inocular bacterias fijadoras de nitrógeno o promotoras de crecimiento vegetal (17). Por otra parte, el no evidenciar crecimiento en el tiempo de estudio, no se debe entender como nulidad en la acción de las rizobacterias, pues probablemente era necesario más tiempo de seguimiento. Además se deben tener en cuenta otros factores que pudieron influir en el ensayo. En el caso de esta especie fue posible visualizar la presencia de tallos adyacentes al principal, que presentaban un número considerable de hojas. Lo anterior podría explicar el poco aumento de longitud del tallo principal, debido a que posiblemente, los nutrientes suministrados por las rizobacterias fueron destinados al desarrollo de la totalidad de la planta. Finalmente, se debe destacar que *Serratia liquefaciens* (RBFN16) tuvo el mejor efecto en la altura de esta especie vegetal.

Se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas de *Escallonia paniculata* y no en las de *Vallea stipularis*, pero esto no debe ser

únicamente atribuido a la acción de las rizobacterias en el crecimiento de las plantas, sino que se deben tener en cuenta las exigencias ambientales de cada especie, pues según la literatura, *Escallonia paniculata* es una especie de crecimiento rápido que no es exigente en suelos y *Vallea stipularis* es una especie de crecimiento muy lento y más exigente, ya que prefiere los suelos fértiles y ácidos y es poco resistente a las heladas, lo que puede justificar los resultados obtenidos (25). Teniendo en cuenta todo lo anterior, se puede decir que las plántulas tratadas con estas rizobacterias fijadoras de nitrógeno podrían ser usadas en procesos de restauración una vez alcancen el desarrollo suficiente tanto de su parte aérea como de sus raíces, de manera que puedan adaptarse fácilmente a su ambiente nativo.

La mayor promoción del crecimiento de las plantas fue inducida por *Klebsiella oxytoca* (RBFN 32), que reportó una alta capacidad productora de amonio. Por su parte *Serratia marcescens* (RBFN6) que evidenció la mayor producción de AIA en el ensayo *in vitro* y que además generó una buena concentración de amonio, no se destacó en el ensayo de promoción de crecimiento vegetal. Algo similar reporta Peña (2007), que al inocular una cepa descrita como promotora del crecimiento, con altos valores de producción de AIA, no generó ningún efecto positivo en las plántulas, por el contrario deprimió su crecimiento. Los resultados anteriores, muestran que la producción de hormonas de crecimiento y fijación de nitrógeno *in vitro* no necesariamente determinan la acción biofertilizante de las rizobacterias (50).

A este respecto, es necesario considerar otras condiciones que determinan el proceso de fijación del nitrógeno *in vivo* por parte de las rizobacterias, como el pH, la temperatura, la presencia de nitrógeno combinado, las fuentes de carbono y la capacidad competitiva y antagónica del microorganismo (16). El establecimiento de las bacterias en la rizósfera depende de cada uno de dichos aspectos; a nivel de laboratorio es posible suministrar buenas condiciones de temperatura y aireación, así como todos los nutrientes requeridos y el pH adecuado, mediante un medio de cultivo que facilita la producción de biomasa, enzimas o de un determinado metabolito (51). Caso contrario al ambiente del ensayo en vivero, en el que las bacterias son sometidas a un entorno diferente,

en condiciones de estrés en las que posiblemente su metabolismo se ve reprimido y en muchos casos no pueden sobrevivir.

En el monitoreo realizado al establecimiento bacteriano, durante los tiempos de muestreo se encontraron algunas colonias bacterianas con las características macroscópicas y microscópicas de las que se aplicaron inicialmente. Cabe resaltar que al utilizar un sustrato natural, es decir, suelo sin previo proceso de esterilización, las bacterias aplicadas debían competir con la microbiota natural del suelo rizosférico, que en este caso estaba compuesto por una cantidad considerable de hongos, como se pudo observar en el cultivo. Dicho suelo no se esterilizó porque las rizobacterias debían someterse a su ambiente nativo para comprobar sus beneficios, como lo indica Angulo (2014) que afirma que el proceso de esterilización puede generar una visión errónea del efecto de las rizobacterias en la promoción del crecimiento de las plantas (11).

Finalmente, refiriéndonos a los requerimientos de nutrientes, la proporción que las plantas pueden proveer a los microorganismos varía con respecto a la especie vegetal, por lo cual las rizobacterias inoculadas pueden responder de manera diferente, como lo muestran los resultados de este trabajo, en los que se observan mejores efectos en el crecimiento de *Escallonia paniculata* que de *Vallea stipularis*.

## CONCLUSIONES

- Se aislaron 33 rizobacterias fijadoras de nitrógeno de suelos con y sin cobertura vegetal pertenecientes al ecosistema de Bosque Altoandino, encontrando mayor cantidad de estas en el suelo con cobertura, lo que comprueba que la presencia de plantas es indispensable para el establecimiento de diferentes poblaciones microbianas, siendo esto favorable para el equilibrio del ecosistema.
- Las bacterias identificadas como *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* y *Klebsiella oxytoca* demostraron ser potenciales fijadoras de nitrógeno y productoras de AIA *in vitro* y tal como lo reporta la literatura son potenciales biofertilizantes.
- En los ensayos de crecimiento en vivero, los tratamientos realizados con las bacterias, mostraron diferencias en las variables analizadas frente a los controles para las dos especies vegetales en estudio, pero solo para *Escallonia paniculata* los resultados fueron estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ), lo que coincide con el ciclo de vida de las plantas, ya que *Vallea stipularis* es una especie de crecimiento lento y exigente en suelos, por lo cual no se alcanzaron a evidenciar diferencias significativas en el tiempo de estudio.
- Las rizobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de Bosque Altoandino, favorecieron el crecimiento de especies vegetales nativas de este ecosistema, comprobando que la recuperación y potencialización de bacterias a partir del mismo entorno, es de gran utilidad en procesos de restauración ecológica

## 8. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se proponen las siguientes recomendaciones

- Se recomienda realizar más de una inoculación, con el fin de garantizar que las rizobacterias se mantengan en la rizósfera de las plántulas en la concentración inicial, determinando los tiempos de reinoculación según lo observado en el monitoreo del establecimiento bacteriano.
- El tiempo de medición de los parámetros de crecimiento vegetal en el ensayo en vivero debe ser más prolongado para poder evidenciar con mayor certeza el aporte de las rizobacterias fijadoras de nitrógeno.
- En caso de que la identificación bacteriana sea determinante para los resultados de un estudio similar al realizado, se debe realizar identificación molecular.

## REFERENCIAS

1. Shrimant Shridhar B. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. Revista internacional de investigación microbiológica (Internet). 2012. (citado 29 Mar. 2017); 3 (1): 46-52. Disponible en: [https://www.idosi.org/ijmr/ijmr3\(1\)12/9.pdf](https://www.idosi.org/ijmr/ijmr3(1)12/9.pdf)
2. Orozco C, Martínez P. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. BOSQUE. (Internet). 2009. (citado 30 Mar. 2017); 30 (2): 70-77. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v30n2/art02.pdf>
3. Martínez P, García DG. Bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. Revista del Instituto de investigaciones tropicales (Internet). 2010 (citado 30 de Mar. 2017); 5 (7): 63-76. Disponible en: <http://oaji.net/articles/2015/2338-1439566175.pdf>
4. Moreno LY, GALVIS, F. Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestras de suelo rizosférico. Pastos y Forrajes [Internet]. 2013,[citado 30 Mar.2017], 36 (1) 33-37. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942013000100003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942013000100003&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0864-0394.
5. Mantilla AJ, Cardona G, Peña CP, Murcia U, Rodríguez M, Zambrano MM. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Revista de Biología Tropical (Internet). 2009 (citado 30 Mar. 2017); 57 (4): 915-927. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44918949002>
6. Avellaneda Torres L, Torres Rojas E. Grupos funcionales de microorganismos del suelo asociados a cultivo de papa, ganadería y páramo en el Parque Nacional Natural de Los Nevados, Colombia. Biota Colombiana (Internet). 2015. (citado 5 Abril 2017); 16 (1) 78-87. Disponible en: [http://ipt.sibcolombia.net/sib/resource.do?r=unal\\_gebix](http://ipt.sibcolombia.net/sib/resource.do?r=unal_gebix), publicado el 23/07/2013.
7. Argüello AZ, Madieto N, Moreno LY. Cuantificación de bacterias diazótroficas aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao L.*), por la técnica de Número Más Probable (NMP). Revista Colombiana de Biotecnología. (Internet). 2016 (citado 17 de Abril 2017);18 (2): 40-47. Disponible: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/47678>
8. López FD. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento en cuatro especies leñosas de selva baja caducifolia [Tesis]. Veracruz, México: Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas; 2011.
9. Ma EA, Torres JA. Selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal presentes en una pradera compuesta de pasto *Kikuyo pennicetum clandestinum* y *Ryegrass lolium* sp y evaluación de su eficiencia en el municipio de Nemocón, Cundinamarca. [Tesis]. Bogotá D.C., Corporación



- Universitaria Minuto de Dios. Facultad de Ingeniería; 2013
10. Barreto D, Valero N, Muñoz A, Peralta A. Efecto de Microorganismos Rizosfericos sobre Germinación y Crecimiento Temprano de *Anacardium Excelsum*. Zonas Aridas (internet). 2007. (citado 18 Abril. 2017); 11 (1): 240-250. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/zonasaridas/za11/pdfs/ZA11%2000%20art18.pdf>
  11. Angulo V, Sanfuentes E, Rodríguez F, Sossa K. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de Microbiología (internet). 2014. (citado 18 Abril, 2017); 46 (4): 338-347. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754114700938>
  12. Kasa P, Modugapalem H. Isolation, screening, and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolates of *Azotobacter* and *Trichoderma* and their beneficial activities. Revista de ciencias naturales, biología y medicina (internet). 2015. (citado 18 Abril 2017); 6 (2): 360-363. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4518410/>
  13. Argüello AZ, Moreno LY. Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*). Acta Agronómica. (Internet). 2014 (citado 19 Abril 2017); 63 (3): 238-245. Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v63n3/v63n3a06.pdf>
  14. Escobar C, Horna Y, Carreño C, Mendoza G. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum Mill.* "tomate" en Lambayeque. Scientia Agropecuaria (internet). 2011. (citado 19 Abril 2017); 2 (1): 39 - 49. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/3576/357633697005.pdf>
  15. Moreno LM, Pérez A, Ramírez M, Franco M. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológicos para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). Revista Colombiana de Biotecnología. (internet). 2014. (citado 19 Abril 2017); 16, (2): 45-56. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4997037>
  16. Lara Mantilla C, Villalba Anaya M, Oviedo Zumaqué LE. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología (Internet). 2007. (citado 19 Abril 2017); 9 (2): 6-14. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77690202>.
  17. Bashan Y, Puente E, de-Bashan LE, Hernández JP. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. Research Signpost (Internet). 2008. (citado 19 Abril 2017); 37 (2) 70-93. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/pgpbbook.pdf>
  18. Montenegro AL, Vargas O. Atributos vitales de especies leñosas en bordes de bosque Altoandino de la Reserva Forestal de Cogua (Colombia). Revista de Biología Tropical. (internet). 2008. (citado 22 Abril 2017); 56 (2):

- 705-720. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44918833023>
19. Delgado D, Moreno G. Efecto de dos tipos de restauración sobre dos grupos funcionales microbianos edáficos (PNN Los Nevados, Pereira, Risaralda). (Tesis pregrado en Internet). Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana; 2010 (citado 22 Abril 2017) 27p. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8641/tesis599.pdf?sequence=1>
  20. Franco M, Betancur J, Franco P. Diversidad florística y estructura de remanentes de Bosque andino en la zona de amortiguación del Parque Nacional Natural los Nevados, cordillera central colombiana. *Revistas UN.* (internet). 2010. (citado 22 Abril 2017); 32 (1). Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/view/36193>
  21. Abud M, Torres AM. Caracterización Florística De Un Bosque Altoandino En El Parque Nacional Natural Purace, Cauca, Colombia. *Boletín Científico - Cent Museos - Mus Hist Nat.* (internet). 2016. (citado 22 Abril 2017) 20(1):27–39. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v20n1/v20n1a03.pdf>
  22. Vargas O. Guía metodológica para la RESTAURACIÓN ECOLÓGICA del bosque Altoandino. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, Convenio Interinstitucional Acueducto de Bogotá – Jardín Botánico – Secretaría Distrital de Ambiente. (internet) 2007. (citado 27 Abril 2017); Disponible en: [http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/user\\_46/file/Guia%20Metodologica.pdf](http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/user_46/file/Guia%20Metodologica.pdf)
  23. Linares P, Vargas O. Estrategias para la restauración ecológica de los bosques altoandinos,,: Universidad nacional de Colombia, (Internet) 2008 (citado 27 Abril 2017) 2 (2) 41 – 56. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/260640030\\_ProblematICA\\_de\\_los\\_bosques\\_altoandinos](https://www.researchgate.net/publication/260640030_ProblematICA_de_los_bosques_altoandinos)
  24. Herbario JBB en línea [Internet]. Colombia: Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis; [actualizado 26 agosto 2014; citado 27 Abril 2017]. Disponible en: <http://coleccion.es.jbb.gov.co/herbario/especimen/7130>
  25. Mahecha Vega GE, Ovalle Escobar A, Camelo Salamanca D, Roza Fernández A, Barrero Barrero D. Vegetación del territorio CAR. 450 especies de sus llanuras y montañas 2012.493 - 555 p.
  26. Camelo M, Vera SP, Bonilla RR. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. (Internet). (citado 11 Mayo 2017). *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2011) 12(2), 159-166. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945031010>
  27. Molina D, Bustillos MR, Rodriguez O. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. (2015) (citado 13 Mayo de 2017). *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.* 17(2): 24 – 34. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/293086504>.

28. Hernández A, Rives N, Acebo Y, Diaz A, Heydrich M, Divan VL. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Protección Veg. [Internet]. 2014 Abr [citado 13 Mayo 2017]; 29( 1 ): 1-10. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522014000100001&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100001&lng=es)
29. Calvo S. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, Salamanca, España. Universidad de Salamanca (Internet). 2011. (citado 15 Mayo 2017); CT (3): 173-186. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3761553.pdf>
30. Rodríguez C. García S. Subramaniam P. La fijación de nitrógeno atmosférico una biotecnología en la producción agraria. Salamanca España. Instituto de Recursos naturales y agrobiología (internet) 1984. (citado 17 Mayo 2017); Disponible en: [http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/nitrogeno\\_atmosferico.pdf](http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/nitrogeno_atmosferico.pdf)
31. Cerón L, Aristizábal F. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos, Bogotá Colombia. Rev. colomb. biotecnol (Internet). 2012. (citado 15 Junio 2017); 14 (1):. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752012000100026&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000100026&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
32. Mayz J. Fijación biológica de nitrógeno. Revista UDO agrícola. Maturín, estado de Monagas [Internet]. 2004 (citado 18 Junio de 2017) 4 (1):1-20. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221548.pdf>
33. Soto L, Baca B. Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. Revista Latinoamericana de Microbiología [Internet]. 2001 (citado 18 Junio 2017) 43:37-49. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2001/mi011f.pdf>
34. 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 18 Junio 2017) 27: 137-142. Disponible en: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/27/PDF/16-CUANTIFICACION.pdf>
35. Vega P, Canchignia H, González M, Seegerl M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Revista cultrop [Internet]. 2016 (citado 18 Junio 2017) 37 (1): 1819-4087. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362016000500005f](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500005f)
36. Villagrán M, Jiménez A, Soria FJ, Ocete ME. Muestreo aleatorio simple y muestreo sistemático de las poblaciones de *Curculio elephas* ( Gyllenhal ) ( Col : curculionidae ) y *Cydia fagiglandana* ( Zeller ) ( Lep : tortricidae ) en encinas. Bol San Veg Plagas. [internet] 2002; (Citado 19 Julio 2017) 28:59–66. Disponible en: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/44394/Muestreo%20aleatorio%20simple.pdf?sequence=1>

37. Osorio W. Toma de muestras para suelos para evaluar fertilidad del suelo. Manejo Integr Suelo y Nutr Veg [Internet]. 2012; (Citado 19 Julio 2017) 1(1):1-4. Disponible en: [http://www.walterosorio.net/web/sites/default/files/documentos/pdf/1%20%20Toma%20de%20muestras%20de%20suelos%20evaluacion%20de%20fertilidad%20del%20suelo%20%20Walter%20Osorio\\_0.pdf](http://www.walterosorio.net/web/sites/default/files/documentos/pdf/1%20%20Toma%20de%20muestras%20de%20suelos%20evaluacion%20de%20fertilidad%20del%20suelo%20%20Walter%20Osorio_0.pdf)
38. Mantilla ME. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en periodo de enraizamiento. [Tesis]. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias; 2007.
39. Celis LX, Gallardo IR. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido indol acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. [Tesis]. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias; 2008.
40. Aguilar H, Coral J. Caracterización de *Bacillus* spp. asociadas a la rizósfera de *Jatropha curcas* L., “piñón blanco”, en Lambayeque y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas. 2012 [Tesis] Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Perú.
41. SEMARNAT S. Salinidad del suelo. 2010; 58. Disponible en: <https://www.cofupro.org.mx/cofupro/images/contenidoweb/indice/publicacionesnayarit/FOLLETOS%20Y%20MANUALES/FOLLETOS%20IMTA%202009/folleto%206%20salinidadelsuelo.pdf>
42. Henríquez M, Pérez, J, Gascó JM., Rodríguez O, Determinación de la capacidad de intercambio catiónico en arena y caolín usando acetato de amonio, acetato de sodio y cloruro de amonio. Bioagro [en línea] 2005, 17 [Fecha de consulta: 5 de Enero 2018] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85717108>>
43. Khalabajadi S. La acidez del suelo, una limitante común para la producción de café. Avances técnicos cenicafe. [Internet]. 2016 (citado 5 Enero 2018) 466: 1-12. Disponible en: <http://www.cenicafe.org/es/publications/AVT0466.pdf>
44. Lizarazo PX, Gómez D. Microbiota rizosférica de *Espeletia* spp. de los páramos de Santa Inés y de Frontino-Urrao en Antioquia, Colombia. Acta biol. Colomb.(Internet). 2015; (citado 5 de Enero 2018) 20(1):175-182. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.42827>
45. Lara, C; Oviedo, Luis E y Betancur, CA. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Trop.* [Internet]. 2011,(citado 10 Enero 2018) 29, (2), pp. 187-194. Disponible en: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692011000200005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692011000200005&lng=es&nrm=iso)>.
46. Schoebitz IMC. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Fac Ciencias Agrar Esc Agron. [Internet]. 2006; (citado 10 Enero 2018). 62. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fas364a/doc/fas364a.pdf>
47. Ortega E, Fernández L, Ortega-rodés P, Rodés R. La fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar. [Internet]. 2004. (citado 15 Enero 2018)

- Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/200042092\\_La\\_fijacion\\_biologica\\_del\\_nitrogeno\\_en\\_la\\_cana\\_de\\_azucar](https://www.researchgate.net/publication/200042092_La_fijacion_biologica_del_nitrogeno_en_la_cana_de_azucar)
48. Mora A, Chávez C, Fonseca G, Cabra JA, Salgado Y. Desarrollo de un inóculo microbiano empleando lodos activados para la remoción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) mediante biofiltración. Rev. Colomb. Biotecnol. (Internet) 2005. (citado 15 Enero 2018) 6 (2) 26-34. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/493/885>
  49. Criollo PJ, Obando M, Sánchez L, Bonilla R. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. Rev Corpoica. [internet] 2012; 13(2):189–95. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v13n2/v13n2a09.pdf>
  50. Peña Haydee B., Reyes Isbelia. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). INCI [Internet]. 2007. [citado Enero 2018]; 32( 8 ): 560-565. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007000800013&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000800013&lng=es).
  51. Angulo-Cortés JP, García-Díaz A, Pedroza AM, Martínez-Salgado MM, Gutiérrez-Romero V. Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. Univ Sci. [internet] 2012; (citado Enero 2018) 17(1):43–52. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v17n1/v17n1a05.pdf>

## ANEXOS

Anexo 1. Composición medios de cultivo selectivos para rizobacterias fijadoras de nitrógeno.

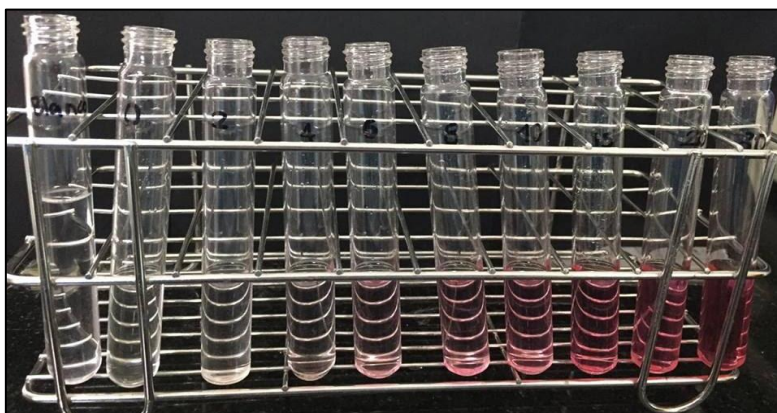
AGAR ASHBY (pH: 7.0)		AGAR NFB (pH: 6.8)		AGAR JMV (pH: 4.5)	
Ingredientes	Cantidad por Litro	Ingredientes	Cantidad por Litro	Ingredientes	Cantidad por Litro
Sacarosa	5 g	Ácido málico	3 g	Manitol	3 g
Manitol	5 g	Glucosa	2 g	Sacarosa	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (sol.10%)	5 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (sol.10%)	2 ml
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O (sol.10%)	2ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (sol.10%)	15 ml
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.005 g	NaCl (sol.10%)	1ml	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O (sol.10%)	2 ml
NaCl	0.2 g	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O (sol.1%)	2ml	NaCl (sol.10%)	1ml
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.2 g	Azul de bromotimol (0.5% en KOH 0.2N)	2ml	CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O (sol.1%)	2ml
Agar agar	15 g	Solución de micronutrientes	2ml	Azul de bromotimol (0.5% en KOH 0.2N)	2ml
		EDTA-Fe (sol 1.64%)	4ml	Solución de micronutrientes	2ml
		Solución de vitaminas	1ml	EDTA-Fe (sol 1.64%)	4ml
		Agar agar	15 g	Solución de vitaminas	1ml
				Agar agar	15 g

Anexo 2. Registro de las Rizobacterias Fijadoras de Nitrógeno purificadas y criopreservadas. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA)

1.DATOS GENERALES				
Fecha de diligenciamiento	Día: 12	Mes: Marzo	Año:2017	
Titulo del proyecto: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE RIZOBACTERIAS NATIVAS DE BOSQUE ALTO ANDINO DE USME PARA USO EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA				
Responsables del proyecto: Gabriela Gomez Avendaño. Johana Cristina Hernandez Vega. Diego Fernando Gonzalez Perez.				
2. INFORME SOBRE EL MATERIAL RECOLECTADO				
2.1 Metodología usada para la preservación de muestras				
Código de la cepa	Protocolo de preservación	Embalaje	No. de cepas recolectadas	Fecha
RBFN01	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN02	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN03	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN04	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN05	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN06	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN07	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN08	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN09	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	12/agosto/2016
RBFN10	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN11	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN12	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN13	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN14	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN15	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN16	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN17	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN18	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN19	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN20	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN21	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN22	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN23	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN24	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN25	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN26	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN27	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN28	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN29	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN30	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN31	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN32	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016
RBFN33	Criopreservación	Tubos eppendorf	2	04/noviembre/2016

### Anexo 3. Curva de calibración y tabla de absorbancias AIA

Se obtuvo la siguiente curva de calibración a partir del ácido indolacético comercial con reactivo de Salkowski

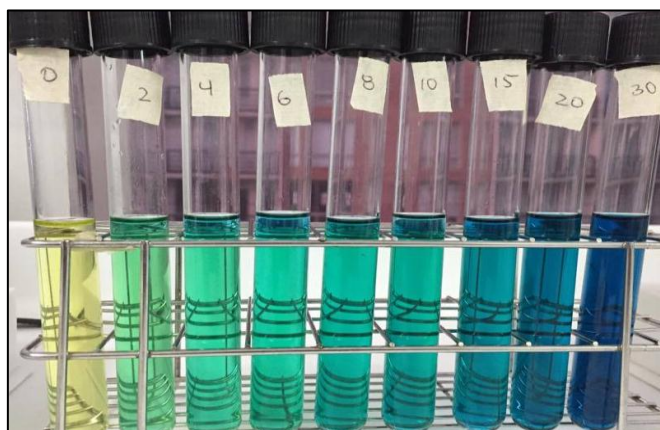


Lectura de absorbancia a 530nm de la curva de calibración de AIA

Concentración (ug/mL)	Media de absorbancias
0	0,006
2	0,014
4	0,066
6	0,158
8	0,214
10	0,292
15	0,443
20	0,582
30	0,855
40	1,122

### Anexo 4. Curva de calibración y tabla de absorbancias ión amonio.

Se obtuvo la siguiente curva de calibración a partir de un patrón de cloruro de amonio. (NH<sub>4</sub>Cl).





Lectura de absorbancia a 632nm de la curva de calibración de AIA

Concentración (ug/mL)	Media de absorbancias
0	0,000
2	0,426
4	0,837
6	1,108
8	1,542
10	1,845

Anexo 5. Medición de densidad óptica para las curvas de crecimiento de los bioinóculos.

	0 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas	60 Horas	84 Horas
RBFN 6	0	0,450	0,520	0,558	0,636	0,641
RBFN 16	0	0,633	0,633	0,783	0,791	0,801
RBFN 28	0	0,416	0,448	0,468	0,515	0,524
RBFN 30	0	0,466	0,631	0,678	0,686	0,689
RBFN 32	0	0,450	0,600	0,638	0,665	0,672

Anexo 6. Panel bioquímico BBL Crystal E/NF para identificación de las rizobacterias seleccionadas para ensayo en vivero.

RBFN 6



RBFN 16



RBFN 28



RBFN 30



RBFN 32



Anexo 7. Formato de recolección de datos para cada especie.

Altura de plantas control de *Escallonia paniculata*

# PLANTA	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	Tratamiento	Usme
	05/09/2017	21/09/2017	06/10/2017	15/10/2017	30/10/2017	11/14/2017	11/28/2017		
1	7	9,1	13	19,3	23,3	29	38	CONTROL	Usme
2	7,5	7,5	8	10	13	17	24,5	CONTROL	Usme
3	6,8	6,8	6,9	9,5	10,8	16	23	CONTROL	Usme
4	7	11	16	19	23	28	34	CONTROL	Usme
5	9	13,8	20	27	36,2	40,1	41	CONTROL	Usme
6	9,1	13	18	24,3	29,2	32	34	CONTROL	Usme
7	6	6,2	6,3					CONTROL	Usme
8	9	11	15	21,9	23	27,4	30	CONTROL	Usme
9	3,5	4,9	7,2	10,9	13,4	16	21	CONTROL	Usme
10	7,9	12,5	18	16	28	31,1	32	CONTROL	Usme

## Altura de *Escallonia paniculata*

# PLANTA	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	M ALTURA cm	Tratamiento	Suelo
	05/09/2017	21/09/2017	06/10/2017	15/10/2017	30/10/2017	11/14/2017	11/28/2017		
1	7,4	7,7	8,1	12,5	15,9	25,2	35	T1	Usme
2	12,8	13	13,1	14,4	17	23	45	T1	Usme
3	11,4	11,5	12	15,5	19,7	28,7	39,3	T1 Col 6.	Usme
4	13,7	14,3	15,1	18,2	20	26	46,2	T1	Usme
5	13	13,2	13,7	13,5	14,1	15,8	17,7	T1	Usme
6	5,5	6,5	7,1	10	11	14	24	T2	Usme
7	4,1	11,3						T2	Usme
8	8,8	12,2	18,5	27	31,2	43,8	55	T2 Col 16.	Usme
9	10,5	16	23	31,2	38,5	47,2	60	T2	Usme
10	7,3	7,9	10,5	14,2	18	25	39	T2	Usme
11	9,4	10,5	13,4	17,2	21,6	33,7	42	T3	Usme
12	12,5	13	13,5	14,9	18,4	27,5	40	T3	Usme
13	9,2	14,3	17,9	23,2	26,8	34	45	T3 Col 28.	Usme
14	12	12,2	14,5	18,5	24	33,2	45	T3	Usme
15	10,8	16,2	22	28,7	33,7	43	52,5	T3	Usme
16	9,6	15,4	21,1	28,7	35	45	56	T4	Usme
17	8,5	12,6	17	21,7	27	36	47,4	T4	Usme
18	6,9	11,5	16,4	22,8	27,3	39,2	51,5	T4 Col 30	Usme
19	14,3	16,5	16,9	19	22	33,5	45	T4	Usme
20	10	11,5	14,8	20,1	23,9	35,1	44,3	T4	Usme
21	4,5							T5	Usme
22	9,7	15,4	22,4	29,8	36,5	42,9	51,5	T5	Usme
23	6,4	9,3	13,3	19,2	24	34,2	45	T5 Col 32	Usme
24	11	11,2	11,5	15,9	20	29,9	48	T5	Usme
25	10	18,3	26,5	33,8	42,2	48,7	59	T5	Usme

## Número de hojas de *Vallea stipularis*

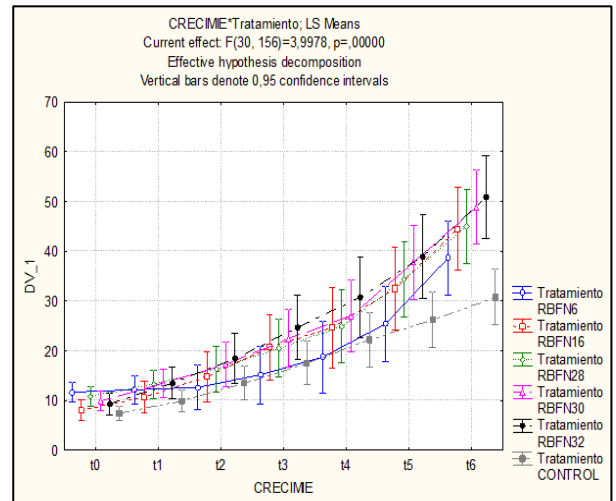
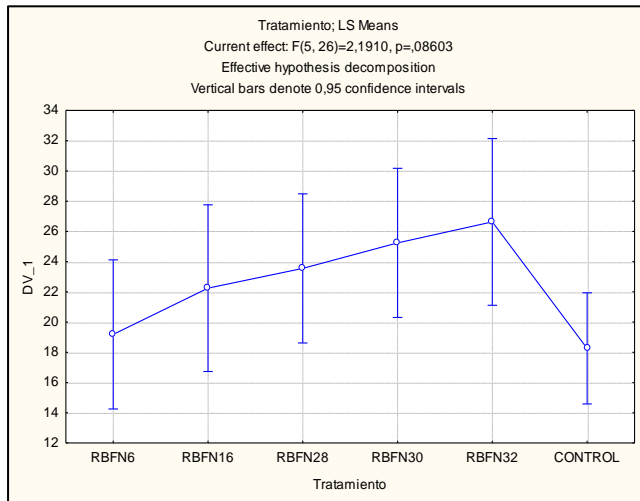
# PLANTA	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	Tratamiento	Suelo
	05/09/2017	21/09/2017	06/10/2017	15/10/2017	30/10/2017	11/14/2017	11/28/2017		
26	8	9	11	15	19	22	27	T1	Usme
27	10	10	11	25	32	39	44	T1	Usme
28	9	10	13	17	19	21	25	T1 Col 6.	Usme
29	6	7	7	11	15	17	20	T1	Usme
30	7	7	9	10	17	21	28	T1	Usme
31	7	8	8	11	16	18	21	T2	Usme
32	10	12	14	14	18	20	24	T2	Usme
33	11	12	13	24	32	37	43	T2 Col 16.	Usme
34	10	12	14	23	29	36	40	T2	Usme
35	7	14	15	22	29	34	38	T2	Usme
36	12	14	15	15	16	16	16	T3	Usme
37	10	10	11	24	29	32	39	T3	Usme
38	11	13	27	30	33	36	41	T3 Col 28.	Usme
39	16	17	18	18	21	23	26	T3	Usme
40	7	9	23	23	24	28	33	T3	Usme
41	12	14	17	23	30	45	61	T4	Usme
42	16	18	24	32	39	43	51	T4	Usme
43	11	12	13	29	33	36	40	T4 Col 30	Usme
44	7	8	9	9	9	9	9	T4	Usme
45	10	11	11	12	12	14	16	T4	Usme
46	10	12	12	15	17	19	23	T5	Usme
47	16	16	22	37	40	44	50	T5	Usme
48	23	31	33	37	39	43	46	T5 Col 32	Usme
49	9	10	12	15	16	18	20	T5	Usme
50	7	10	23	16	25	39	58	T5	Usme

## Número de hojas de plantas control de *Vallea stipularis*

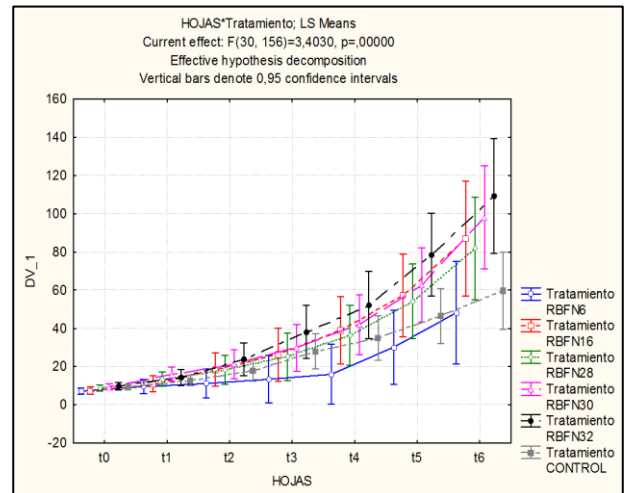
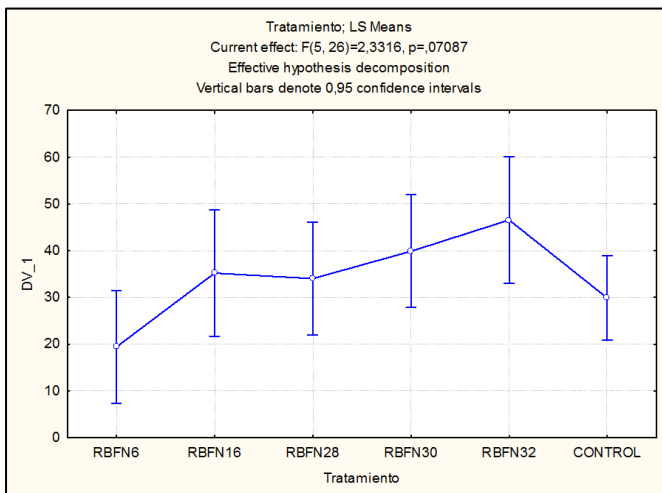
# PLANTA	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	# HOJAS	Tratamiento	Usme
	05/09/2017	21/09/2017	06/10/2017	15/10/2017	30/10/2017	11/14/2017	11/28/2017		
1	14	12	16	19	24	29	38	CONTROL	Usme
2	12	12	16	24	35	40	43	CONTROL	Usme
3	13	13	14	37	41	47	53	CONTROL	Usme
4	9	10	19	22	25	26	29	CONTROL	Usme
5	16	16	16	23	30	34	41	CONTROL	Usme
6	25	19	25	26	35	38	46	CONTROL	Usme
7	11	10	14	18	26	32	37	CONTROL	Usme
8	9	9	9	30	36	39	43	CONTROL	Usme
9	13	13	14	16	17	18	20	CONTROL	Usme
10	7	7	8	9	9	11	14	CONTROL	Usme

## Anexo 8. Gráficas de análisis estadístico para *Escallonia paniculata*.

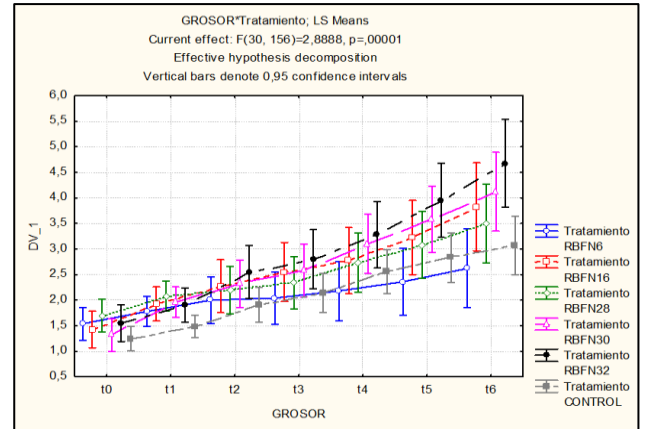
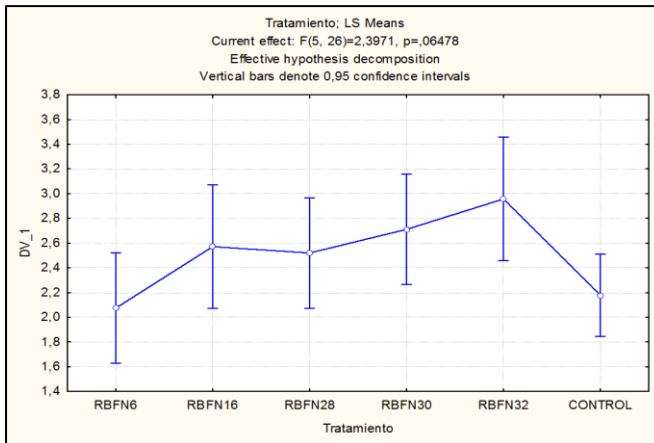
### Altura



### Número de hojas

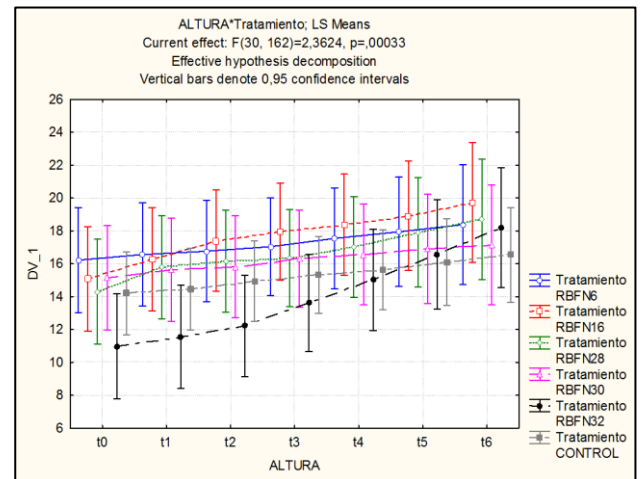
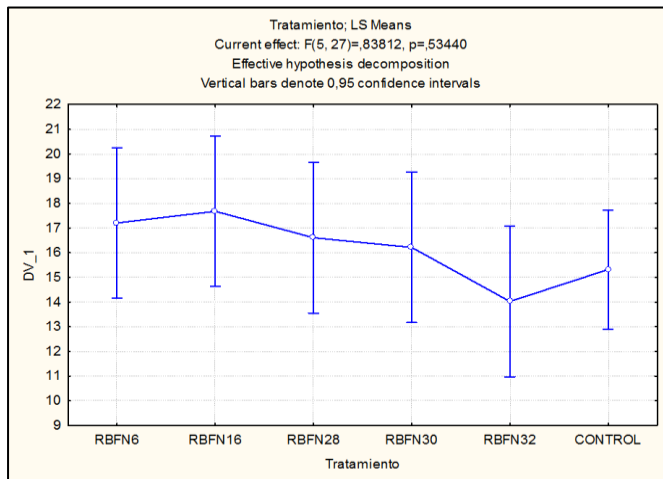


## Grosor

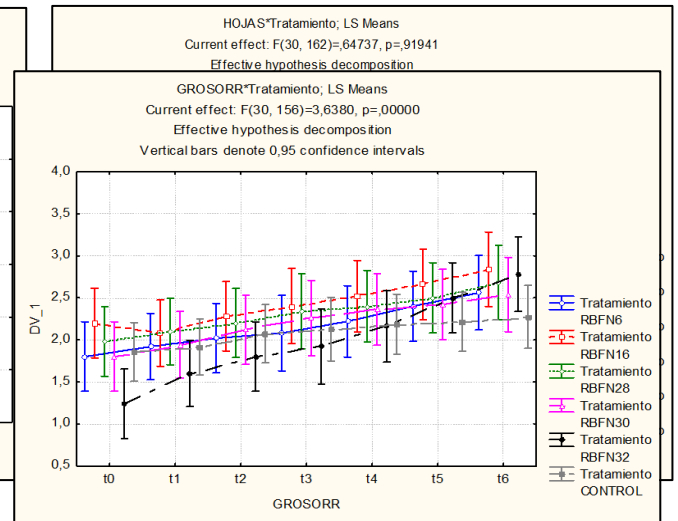
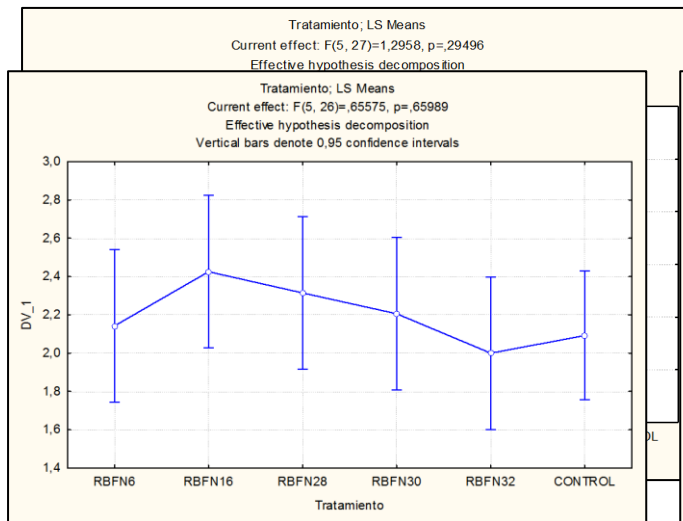


## Anexo 9. Gráficas de análisis estadístico para *Vallea stipularis*.

## Altura



# Número de hojas



# Grosor

