



EVALUACIÓN DE RIZOBACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO AISLADAS DE BOSQUE ALTO ANDINO PARA USO EN RESTAURACIÓN ECOLÓGICA DEL CORREDOR CHINGAZA-SUMAPAZ



JENSSY DANIELA CATAMA GONZALEZ
DIANA MILENA PEREZ RODRIGUEZ

Ana Graciela Lancheros
Asesora interna

Carolina Jaime Rodríguez Msc
Asesora externa

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
INFORME FINAL
BOGOTÁ – Mayo 2018



INTRODUCCIÓN

Bosque Alto Andino

Franja de vegetación que va desde los 2.600 a 3.200 msnm con temperaturas promedio de 15 a 6°C

Desde 1800 hasta nuestros días, se ha transformado del 70 a 93%



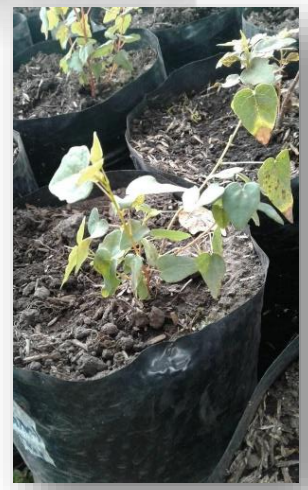
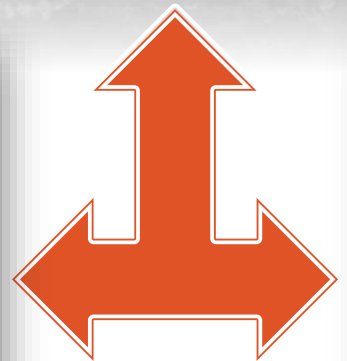
En Colombia, afectados por la presión colonizadora y con más altas tasas de deforestación.

Escallonia paniculata

- Tobo o tibar
- Es un árbol que alcanza los 9 m de altura
- Habitantes típicos de los bosques andinos húmedos



Escallonia paniculata, Catama y Perez, 2018



Vallea stipularis, Catama y Perez, 2018

Vallea stipularis

- Campano, chaque, gague, raque
- Árboles nativos zoócoros de hasta 10 m de alto.
- Propia de bosques altoandinos.

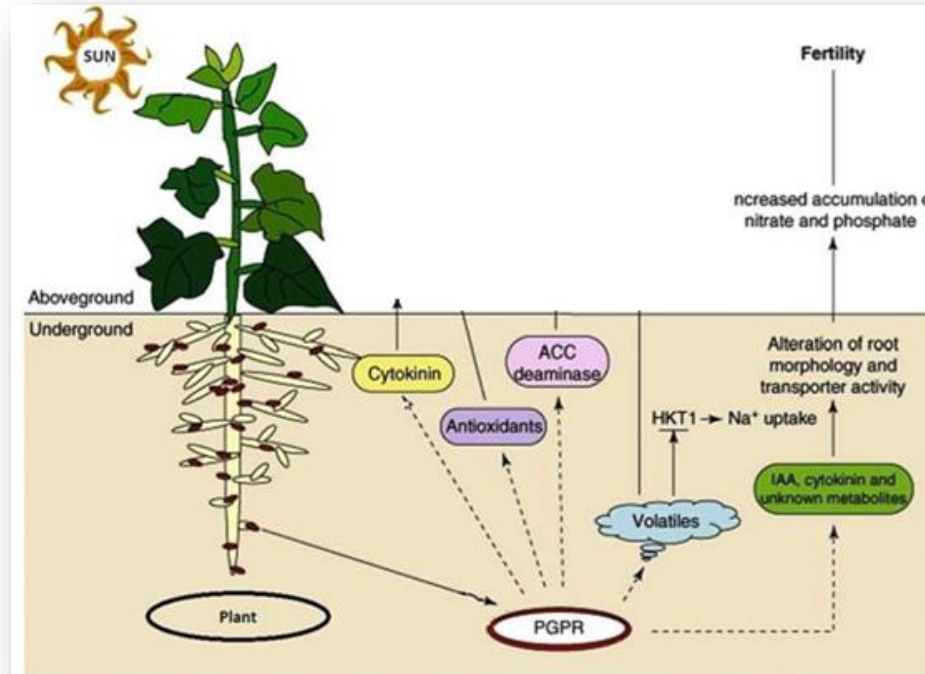
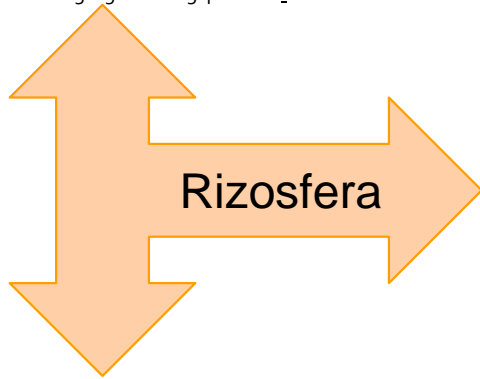
Tomada de: [http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/user_46/file/Guia Metodologica.pdf](http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/user_46/file/Guia%20Metodologica.pdf).



Rizobacterias solubilizadoras de fosforo



Tomado de: agrogenia.blogspot.com;



Tomado de: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEAMU%C3%91OZ%2CDANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Aumento de la nutrición

Factores de crecimiento

AIA influencia en la raíz
Dormancia y germinación

Capacidad

PGRPs

P



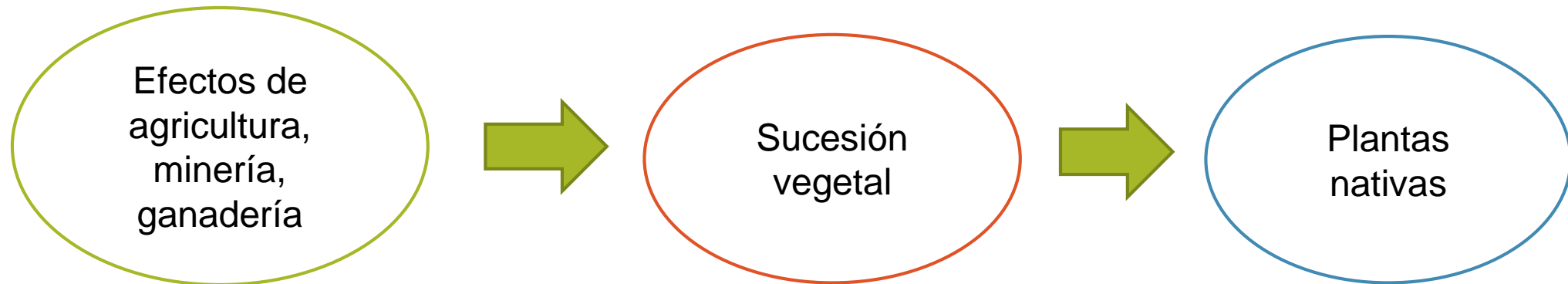
Disolución, mineralización y desorción
Disponibilidad de fósforo

Bacillus sp, Stenotrophomonas sp, Burkholderia sp, Pseudomonas sp, Rhizobium sp, Vibrio proteolyticus, Enterobacter aerogenes y Pantoea sp



Pregunta de investigación

¿Algunas rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas del suelo de usme coadyudan al establecimiento y crecimiento de especies nativas ?





OBJETIVOS

General

Evaluar rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de suelo del Bosque Alto Andino con capacidad PGPR a escala de vivero para posible uso en restauración ecológica.

Específicos

Aislar especies nativas

Caracterizar fenotípica y enzimáticamente

Identificar mediante pruebas bioquímicas

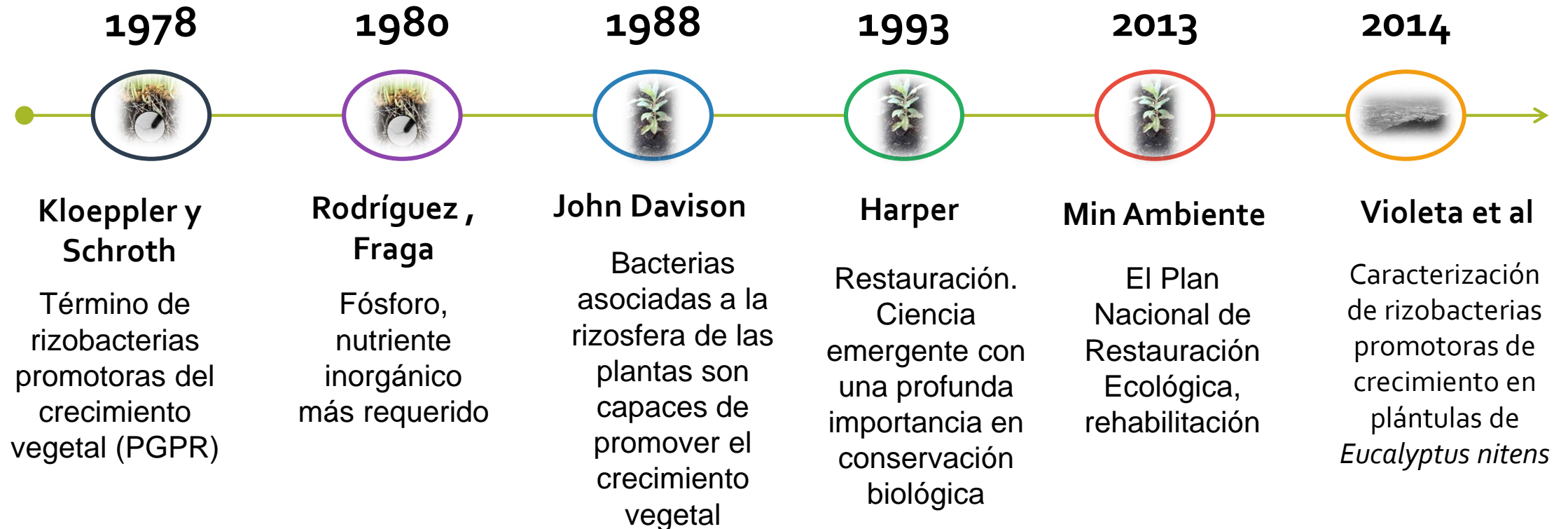
Demostrar la actividad PGPR en plantas de *Escallonia paniculata* y *Vallea stipularis*

RBSF

Vivero



ANTECEDENTES





METODOLOGIA

Fase I. Laboratorio

Fase II. Vivero

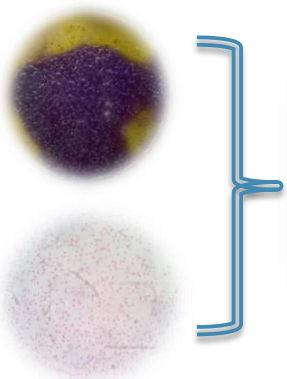
MUESTREO DEL SUELO

Chien y Hammond



ASLAMIENTO Y CONSERVACIÓN

Espitia y Díaz

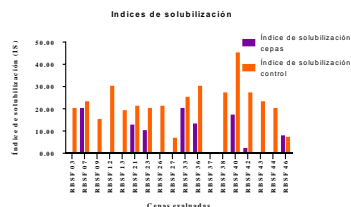


Conservación Cepas: Autores Catama y Perez 2018



EVALUACIÓN ACTIVIDAD ENZIMATICA

Beltrán



SCREENING DE SELECCIÓN

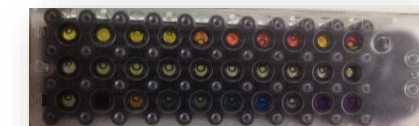
ANALISIS ESTADISTICO DE VARIANZA



BIOENSAYO EN VIVERO



IDENTIFICACIÓN BBL CRYSTAL Y MICROSCAN



DETERMINACIÓN AIA

Gutiérrez y Pérez

Identificación BBL Crystal: Autores Catama y Perez 2018



Resultados y Discusión

Fase I: Laboratorio

Aislamiento y caracterización de rizobacterias solubilizadoras de fosfato

Muestreo #1		
Medio	Dilución	UFC
PSM	10 ⁻⁴	6
SMRS-1	10 ⁻⁴	7
TOTAL		13

Muestreo #2		
Medio	Dilución	UFC
PSM	10 ⁻³	7
	10 ⁻⁴	8
SMRS-1	10 ⁻⁴	11
Pikovskaya	10 ⁻⁴	5
TOTAL		31

Numero de cepas aisladas según medios y diluciones Autores Catama y Pérez, 2018

Control positivo



Inoculo biotecnológico
Azospirillum brasilense
Azobacter chroococcum

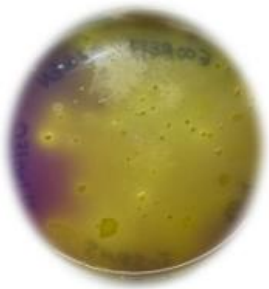


Ubicación astronómica del Bosque Alto Andino, Sede Usme UAN. Google Inc. (2018). Google Earth (Versión 4.482833) [Software]. Disponible desde <https://www.google.com/maps/place/Colegio+Universidad+Antonio+Nari%C3%B1o+Usme/@4.482833>

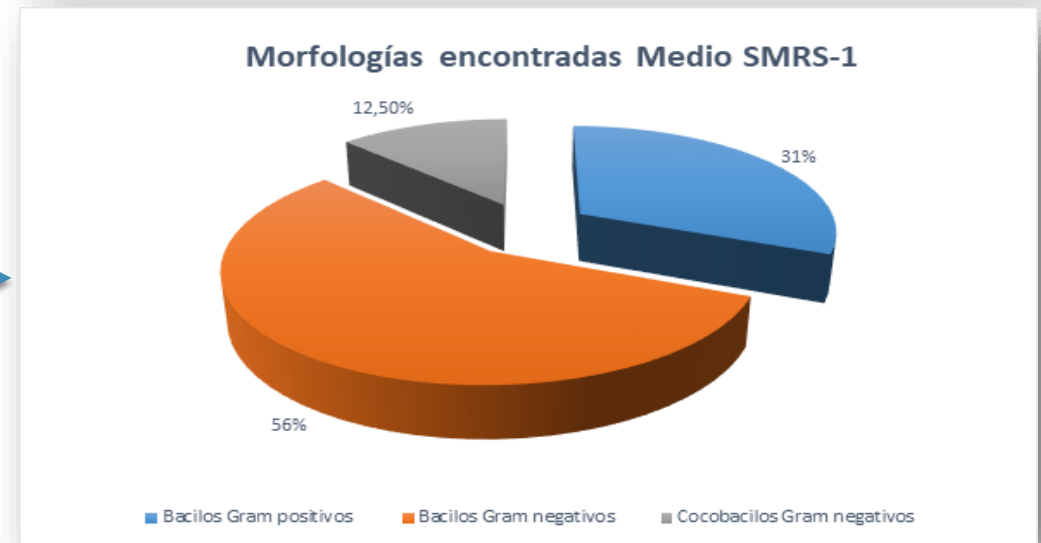
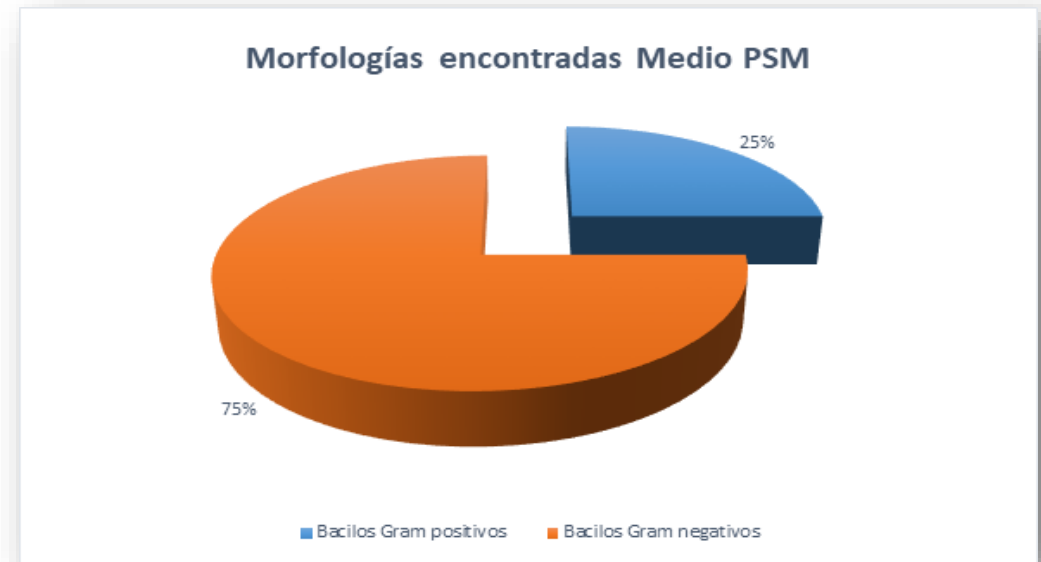
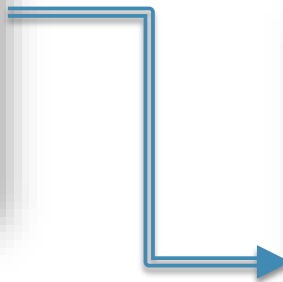


Resultados y Discusión

Muestreo 1

MEDIO SMRS-1	
Dilución 10 ⁻⁴	Descripción macroscópica
	<ul style="list-style-type: none">-Colonias naranja; grande, opacas, bordes regulares.-Colonias grisáceas oscuras; medianas, brillantes, bordes regulares.-Colonias roja; pequeña, borde regular, opaca



Selección de UFC: Autores Catama y Perez 2018





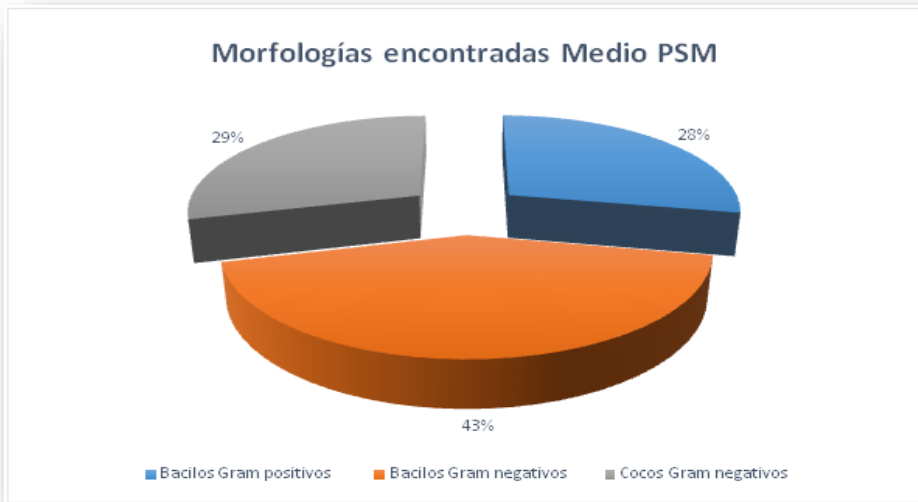
Resultados y Discusión

Muestreo 2

MEDIO SMRS-1	
Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴
Incontables	11 UFC
	

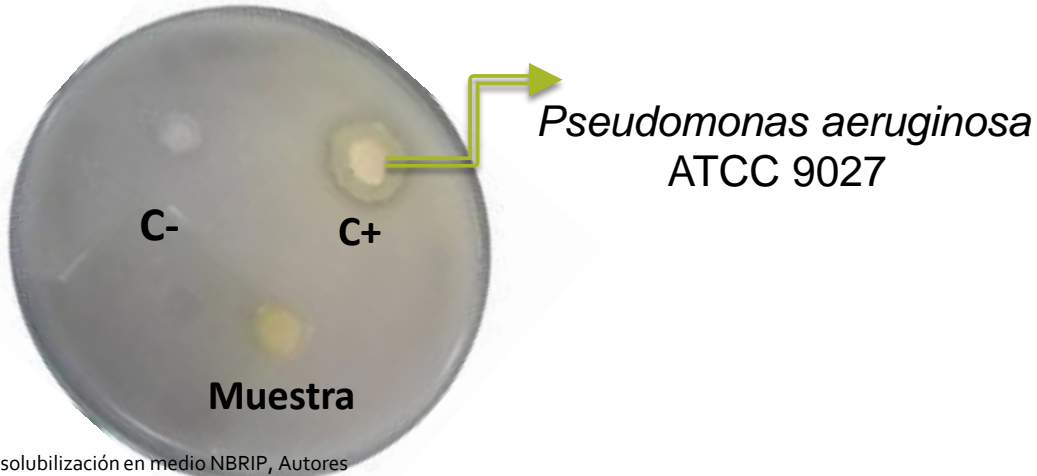
Selección de UFC muestreo - 2: Autores Catama y Perez 2018

CEPAS	AIA CONCENTRACION (µg/ml)	IS (%)
CONTROL +	18	45
RBSF03	6,45	0
RBSF07	8,91	20
RBSF09	7,43	0
RBSF12	6,55	0
RBSF13	8,69	0
RBSF21	16,78	12,5
RBSF23	18	10
RBSF26	1	-
RBSF27	11,3	-
RBSF33	6,68	20
RBSF36	18	13
RBSF37	18	0
RBSF38	4	0
RBSF40	18	17
RBSF42	16,81	2
RBSF43	5,79	0
RBSF44	5,82	0
RBSF46	16,45	0





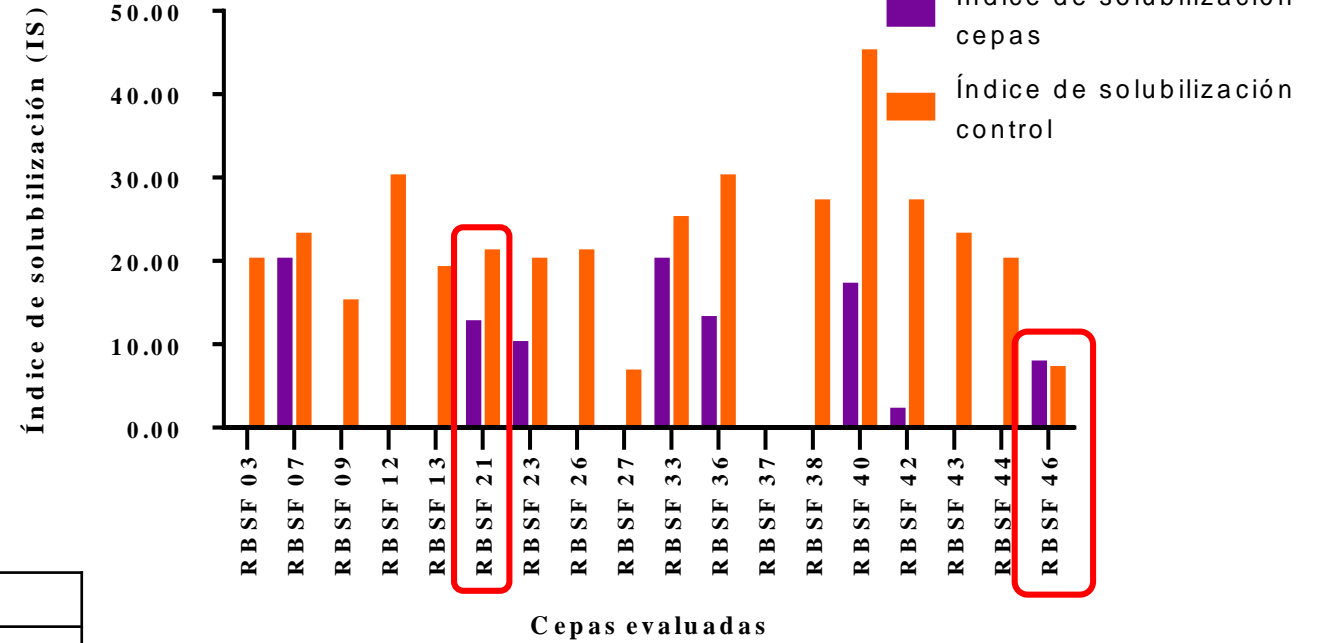
Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfato



Halos solubilización en medio NBRIP, Autores Catama y Perez 2018

Código de aislamiento	Muestra			Control positivo		
	Diámetro de la colonia (mm)	Diámetro del halo de solubilización (mm)	Índice de solubilización %	Diámetro de la colonia (mm)	Diámetro del halo de solubilización (mm)	Índice de solubilización %
RBSF 21	8mm	1 mm	12.5 %	14 mm	3 mm	21.%
RBSF 23	10 mm	1 mm	10%	15 mm	3 mm	20%
RBSF 36	16 mm	2 mm	13 %	13 mm	4 mm	30%
RBSF 40	6 mm	1 mm	17%	11 mm	5 mm	45%
RBSF 46	13 mm	1 mm	7.7%	15 mm	1 mm	7%

Indices de solubilización

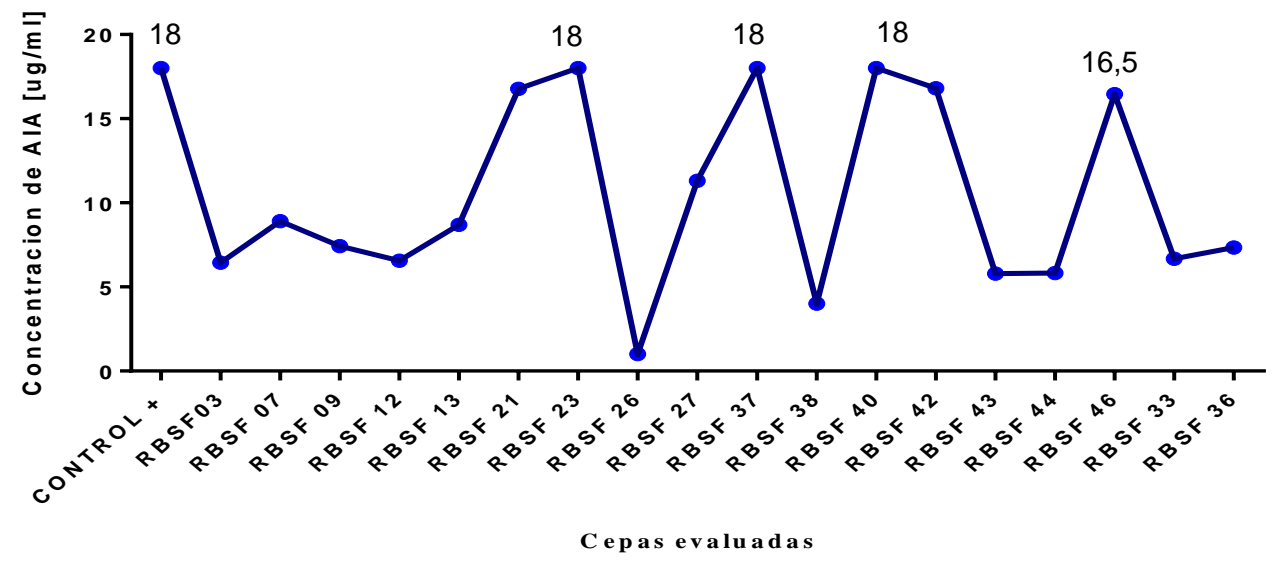
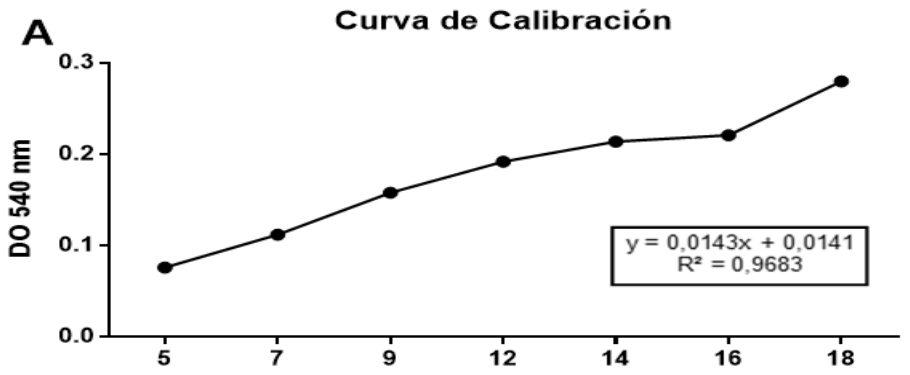


Rangos de solubilización medidos a las 24h (0-10%)
y a las 48h (0-11%)
Corrales, Sánchez et al, 2014
el medio de cultivo NBRIP
Rodríguez, Hernández. 2009

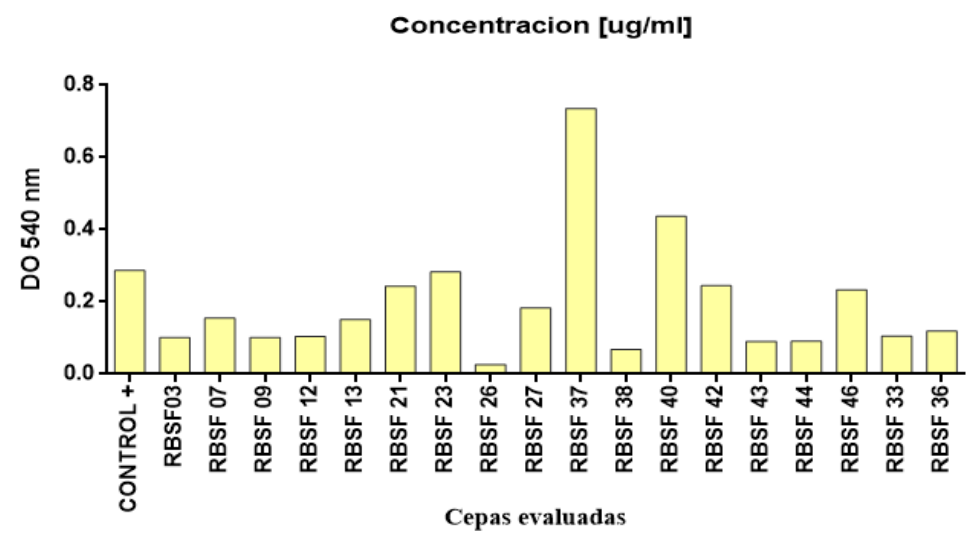


Resultados y Discusión

Ensayo de AIA (Ácido Indol Acético)



Se ha descrito que la concentración de AIA, puede estar controlada por la planta o por rizobacterias.
 El AIA está involucrado en el crecimiento y desarrollo de las plantas, división celular, diferenciación de tejido y respuesta de defensa
Angulo, Sanfuentes, Rodríguez y Sossa. 2014



Las cepas ensayadas produjeron AIA en un amplio rango, desde los 0,5µg/ml hasta 54µg/ml
Gutiérrez y Pérez. 2017

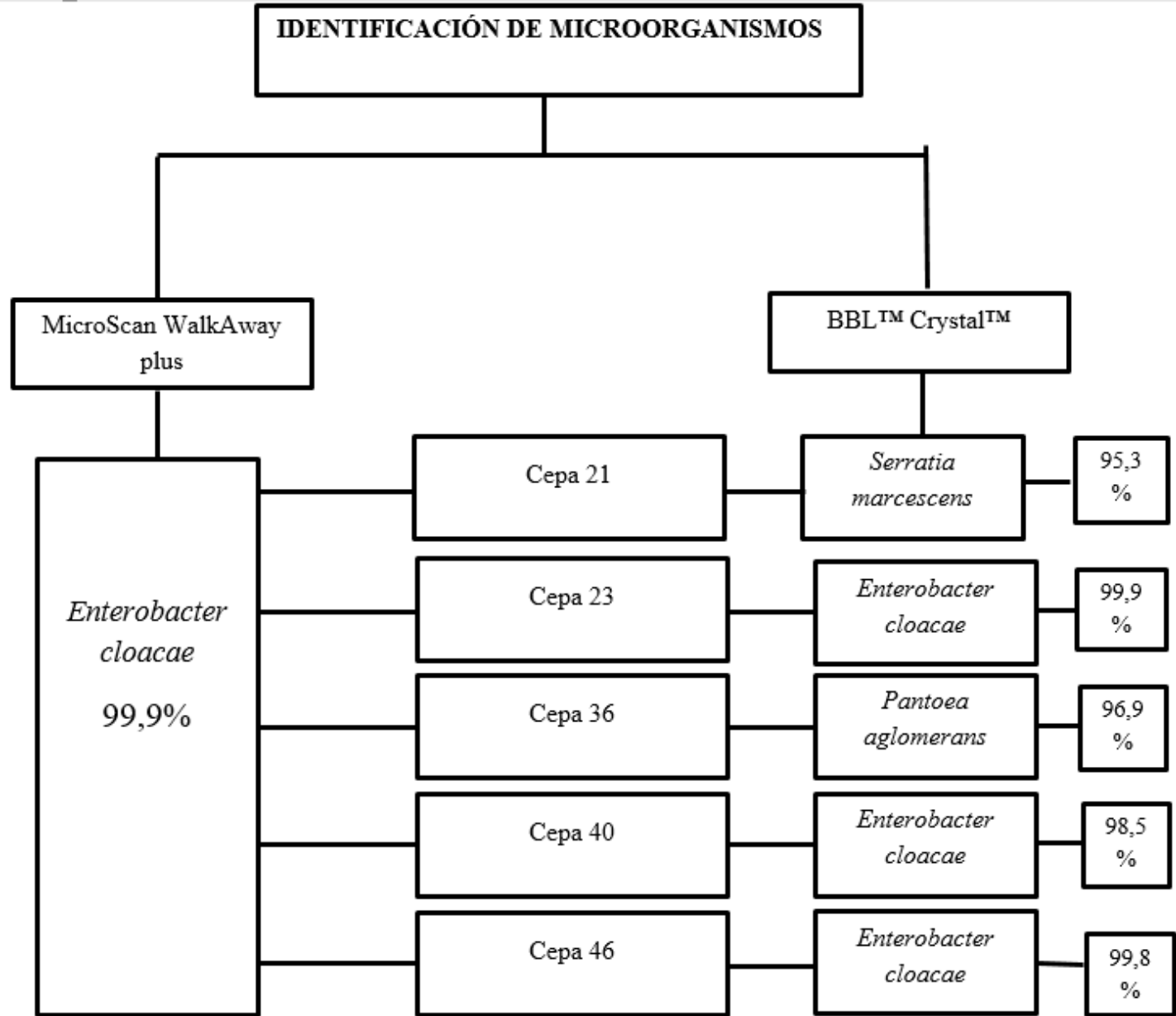


Resultados y Discusión

Enterobacter sp. y *Serratia* sp. son microorganismos capaces de solubilizar fosfato a partir de diferentes fuentes orgánicas
Nieto y Szpinak. 2017

Identificación de bacterias de solubilizadoras de fosfato por el sistema de identificación BD BBLCRYSTAL™ para microorganismos entéricos no fermentadores
Enterobacter cloacae
Beltrán, 2014

Pantoea sp. posee múltiples atributos en el desarrollo vegetal, como actividad solubilizadora de fosfato, siderófora y producción de ácido acético
Walterson y Stavrínides. 2017

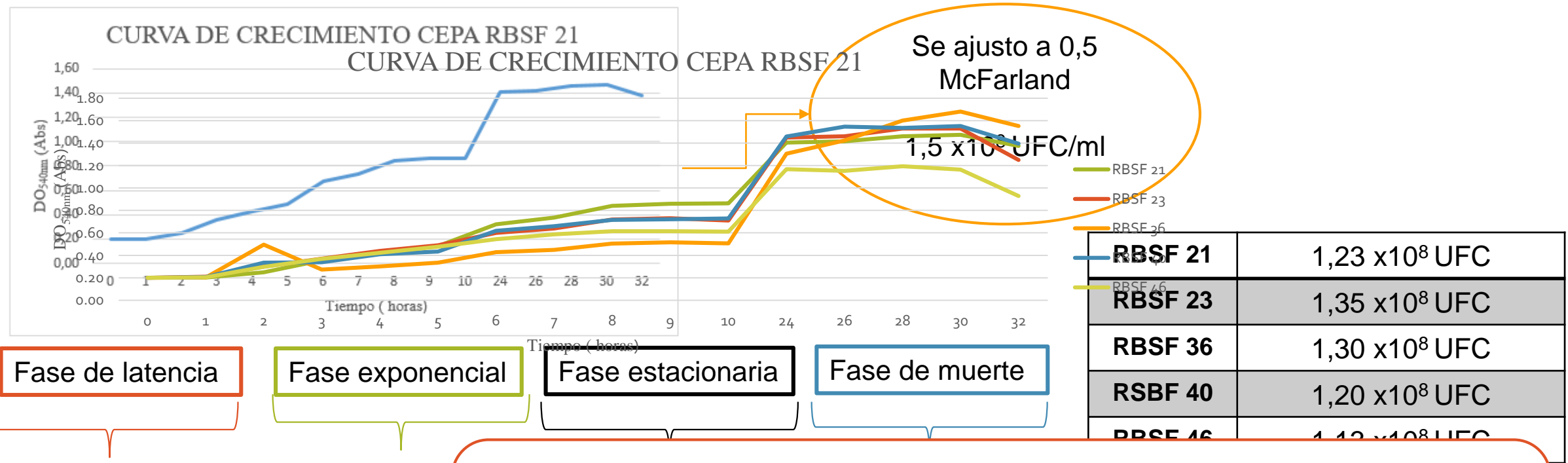




Resultados y Discusión

Fase II: Vivero

Evaluación de tratamientos inoculados a escala de vivero, inóculos y curva de crecimiento



Fase de latencia

Fase exponencial

Fase estacionaria

Fase de muerte

0 a 10 h

11 a 24 h
total de 13 h

✓ Para la fase de estacionaria de la cepa RBSF 21 alcanzo un rango de crecimiento poblacional de $4,05$ a $4,9 \times 10^8$ UFC/ml

RBSF 21, RBSF 23, RBSF 36, RBSF 40, RBSF 46

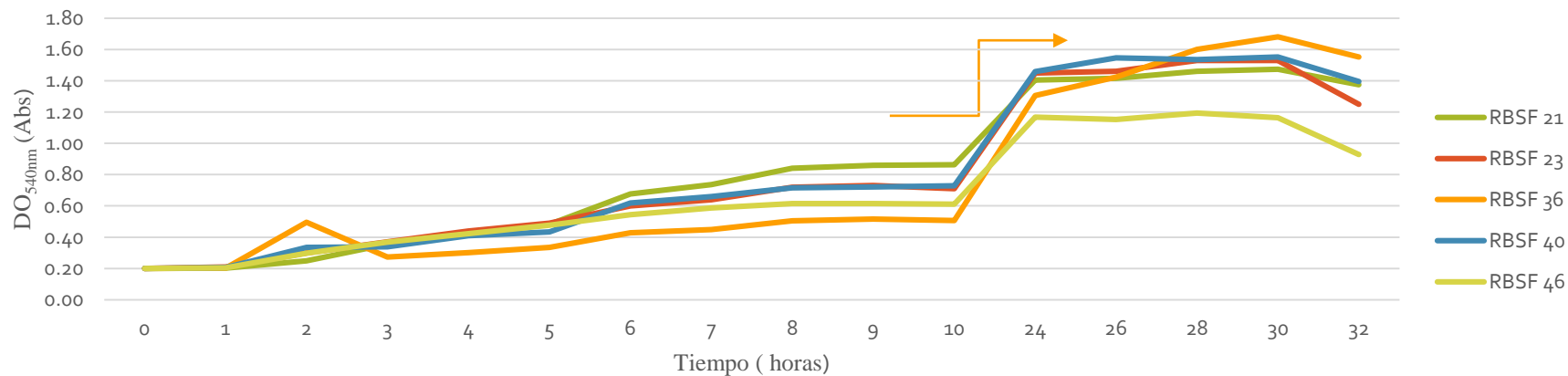


Resultados y Discusión

Fase II: Vivero

Evaluación de tratamientos inoculados a escala de vivero, inóculos y curva de crecimiento

CURVA DE CRECIMIENTO COMPARACION



- ✓ Para la fase de estacionaria de la cepa RBSF 21 alcanzo un rango de crecimiento poblacional de $4,05$ a $4,9 \times 10^8$ UFC/ml

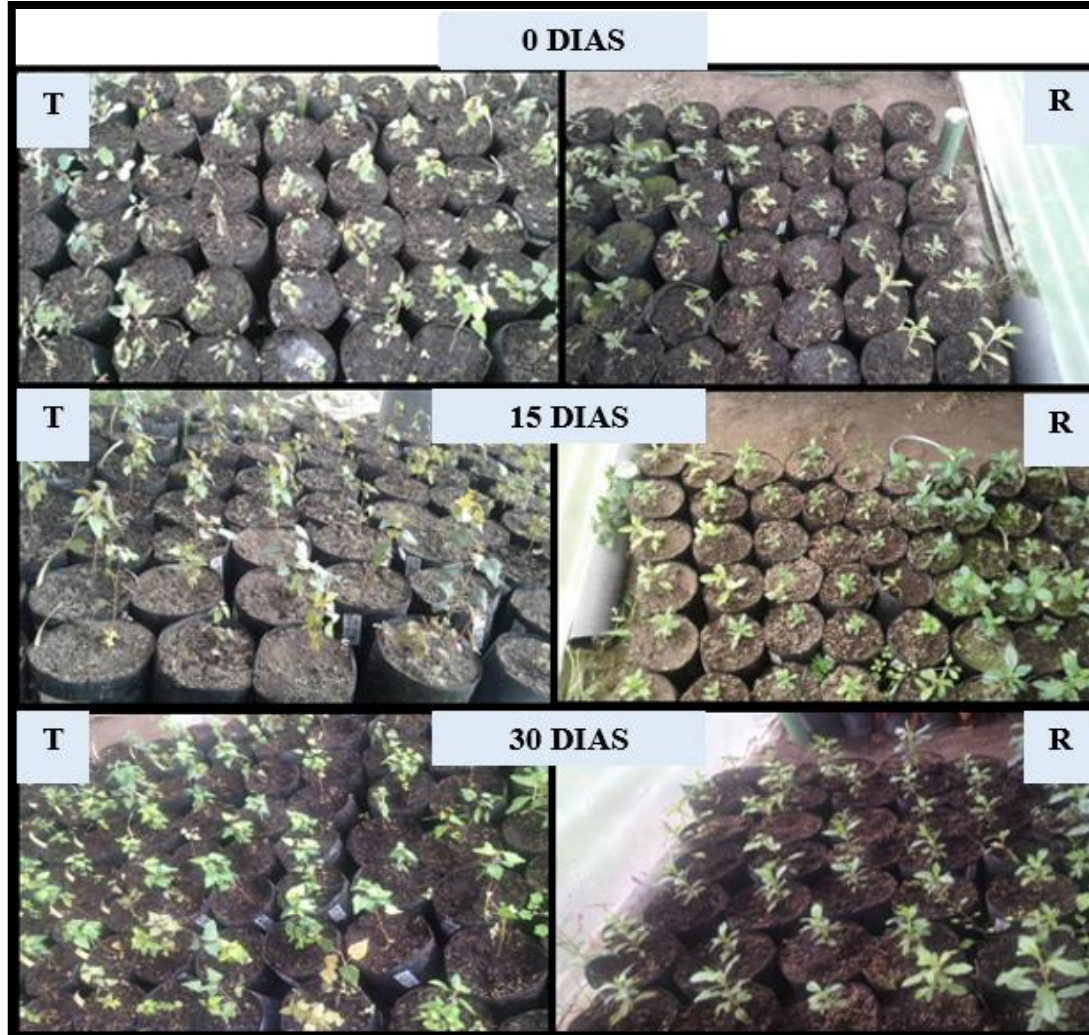
RBSF 21, RBSF 23, RBSF 36, RBSF 40, RBSF 46



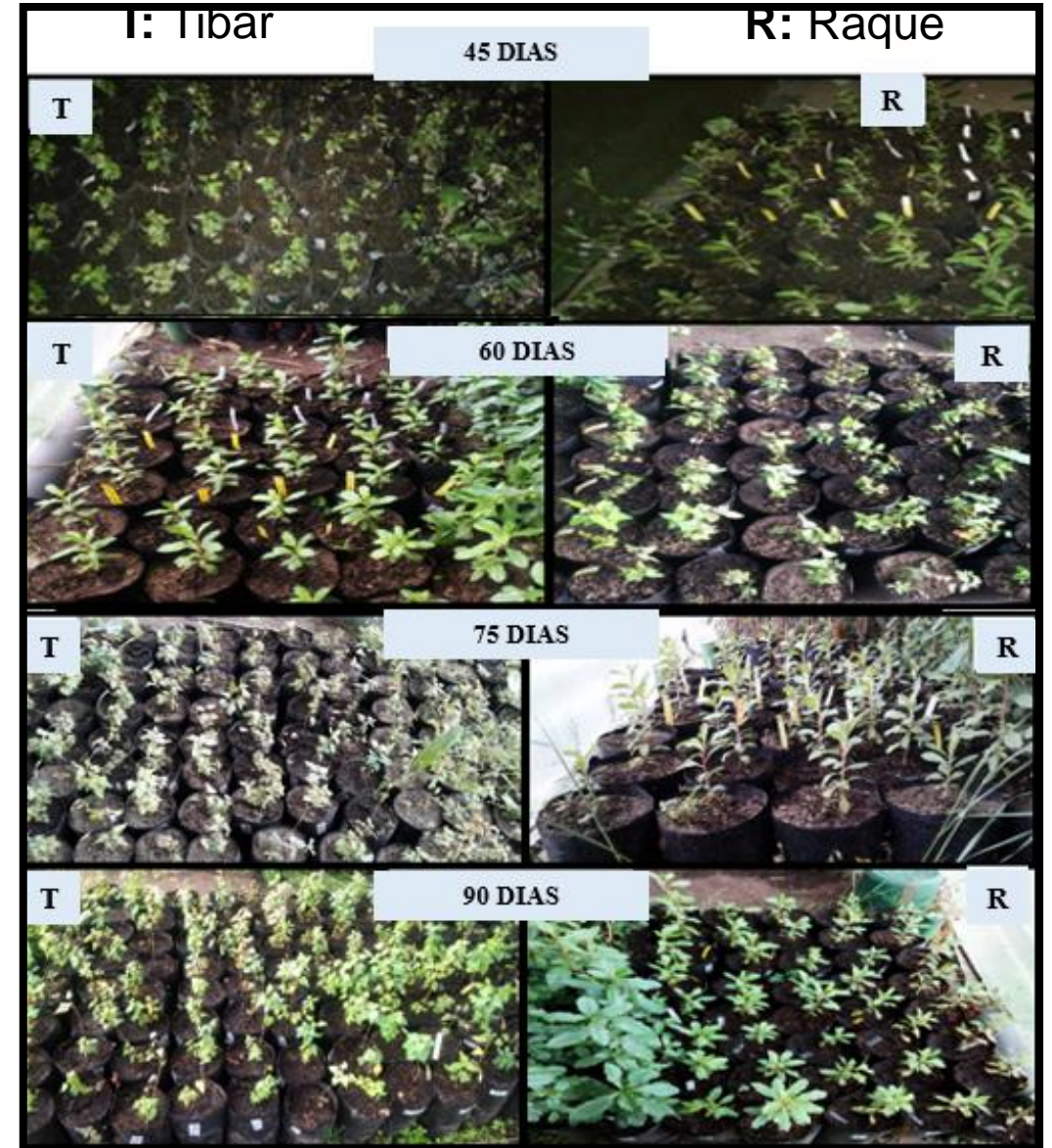
Resultados y Discusión

T: Tibar (*Escallonia paniculata*)

R: Raque (*Vallea stipularis*)



Crecimiento vegetal en los tiempos de medición 1: Autores Catama y Perez 2018



Crecimiento vegetal en los tiempos de medición 2: Autores Catama y Perez 2018



Resultados y Discusión

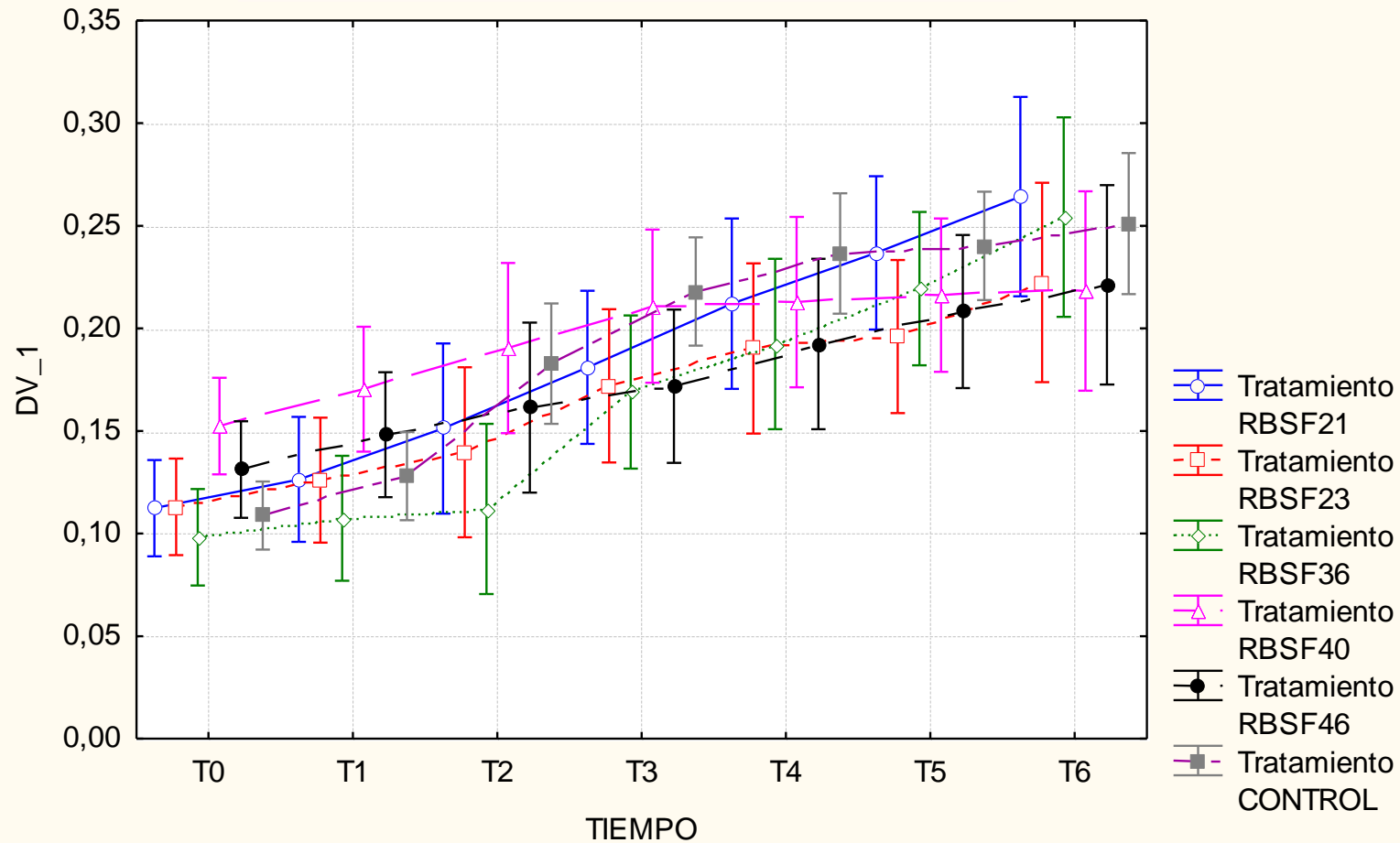
Análisis de datos estadísticos de varianza(ANOVA)

TIEMPO*Tratamiento; LS Means

Efecto actual: F (30,174) =1,9620, p=,00391

Hipótesis efectiva de descomposición

las barras verticales indican 0,95 intervalos de confianza



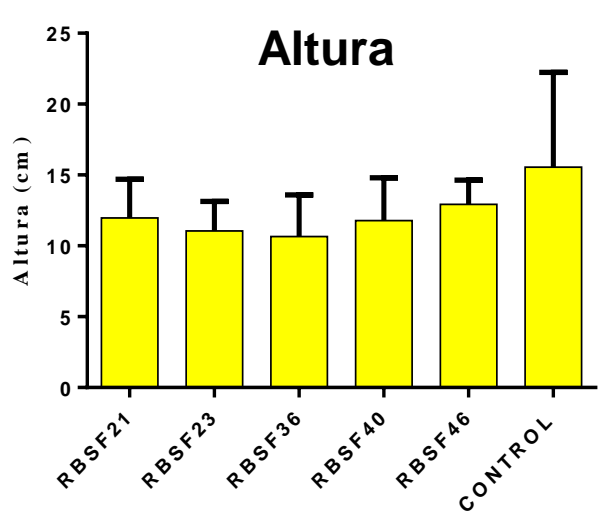
Tibar
(*Escallonia paniculata*)



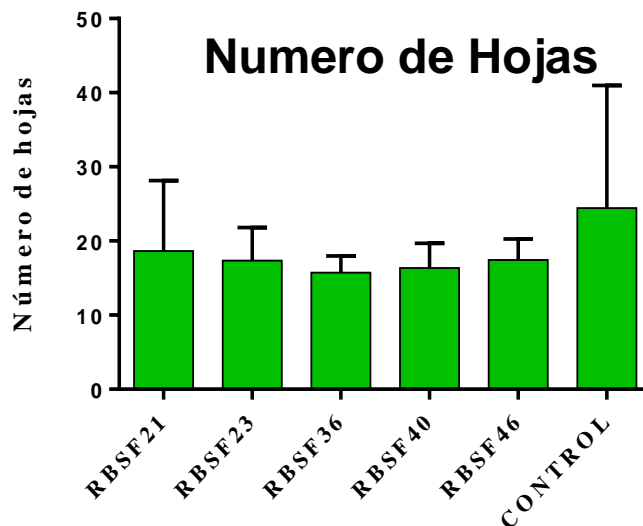
Resultados y Discusión

Análisis de datos estadísticos de varianza

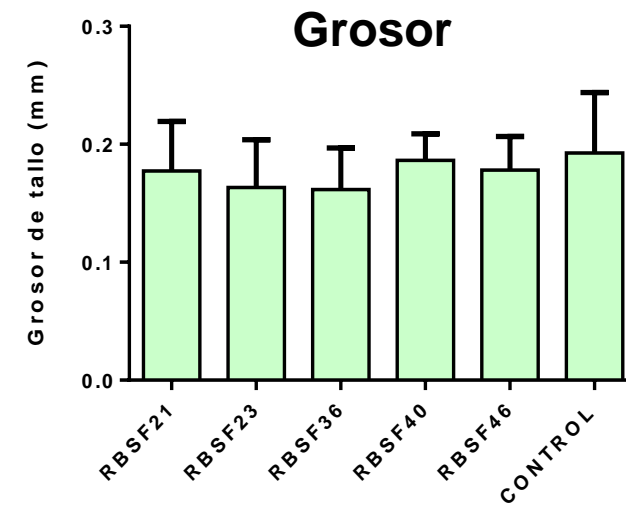
Tibar (*Escallonia paniculata*)



Cepas evaluadas



Cepas evaluadas



Cepas evaluadas

Efecto	Análisis de varianza de medidas repetidas Hipótesis efectiva de descomposición				
	SS	GRADO DE LIBERTAD	MS	F	p
Intercepta	34883,61	1	34883,61	326,9192	0,000000
Tratamiento	843,22	5	168,64	1,5805	0,196843
Error	3094,42	29	106,70		
TIEMPO	3932,87	6	655,48	66,9672	0,000000
TIEMPO*Tratamiento	360,19	30	12,01	1,2266	0,208520
Error	1703,12	174	9,79		

Efecto	Análisis de varianza de medidas repetidas Hipótesis efectiva de descomposición				
	SS	GRADO DE LIBERTAD	MS	F	p
Intercepta	76960,01	1	76960,01	172,4365	0,000000
Tratamiento	2877,11	5	575,42	1,2893	0,295531
Error	12942,97	29	446,31		
TIEMPO	8225,36	6	1370,89	13,9201	0,000000
TIEMPO*Tratamiento	1739,32	30	57,98	0,5887	0,956147
Error	17136,03	174	98,48		

Efecto	Análisis de varianza de medidas repetidas Hipótesis efectiva de descomposición				
	SS	GRADO DE LIBERTAD	MS	F	p
Intercepta	7,435708	1	7,435708	1135,067	0,000000
Tratamiento	0,039769	5	0,007954	1,214	0,327478
Error	0,189976	29	0,006551		
TIEMPO	0,393947	6	0,065658	71,877	0,000000
TIEMPO*Tratamiento	0,053767	30	0,001792	1,962	0,003915
Error	0,158944	174	0,000913		



Resultados y Discusión

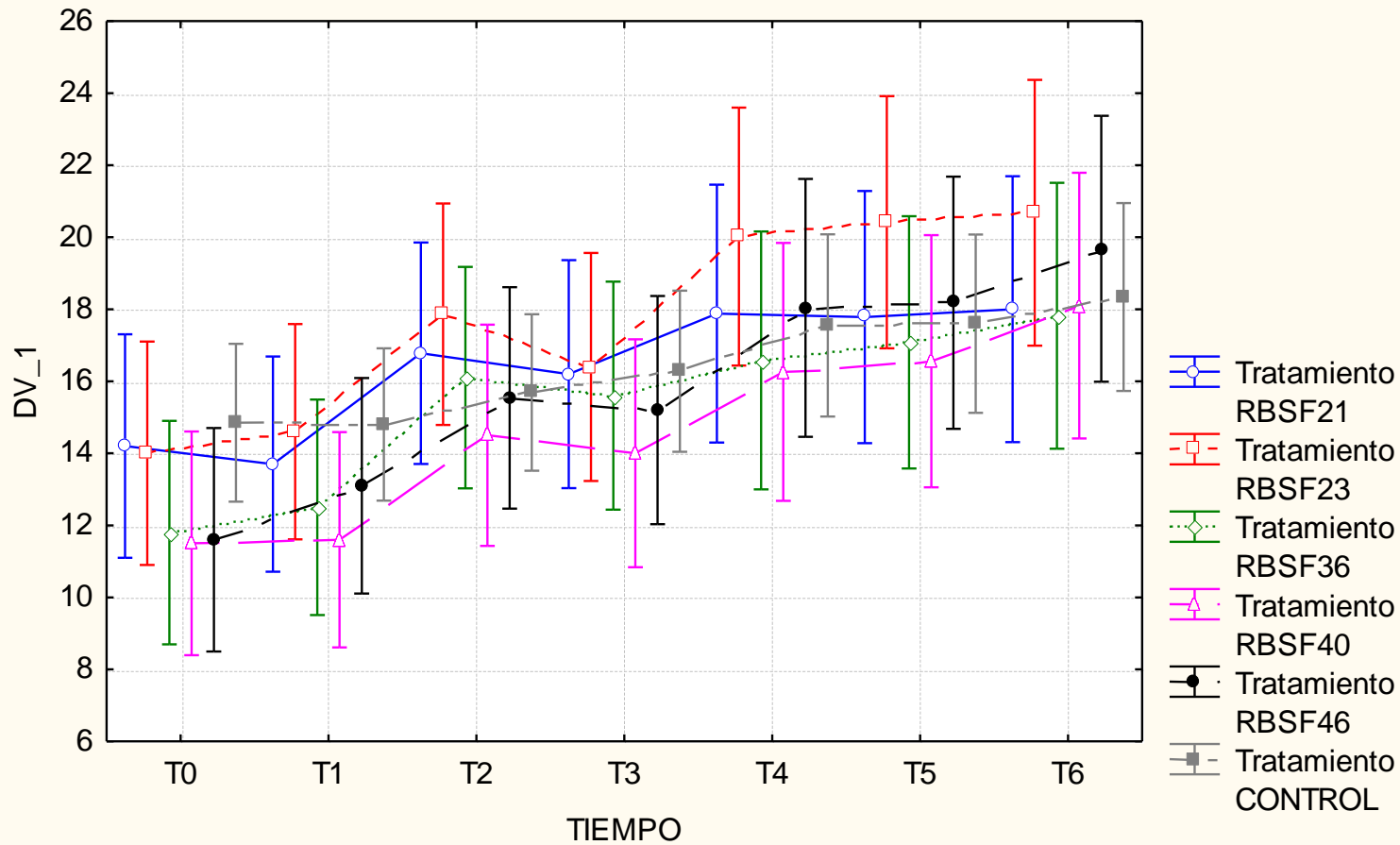
Análisis de datos estadísticos de varianza(ANOVA)

TIEMPO*Tratamiento; LS Means

Efecto actual: $F(30,174) = 1,9620, p = ,00391$

Hipótesis efectiva de descomposición

las barras verticales indican 0,95 intervalos de confianza



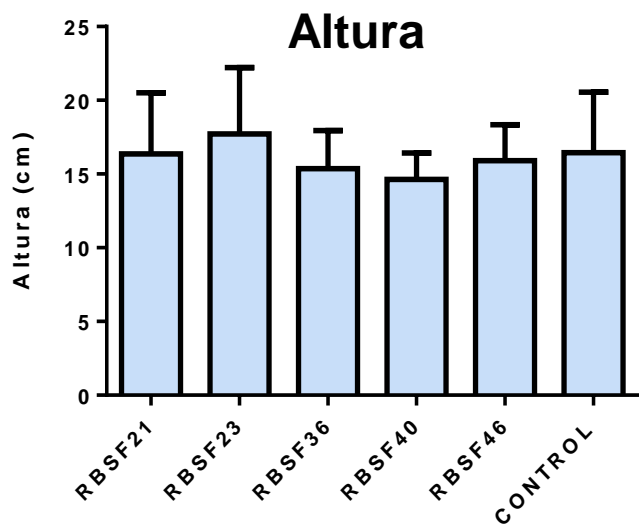
Raque (*Vallea stipularis*)



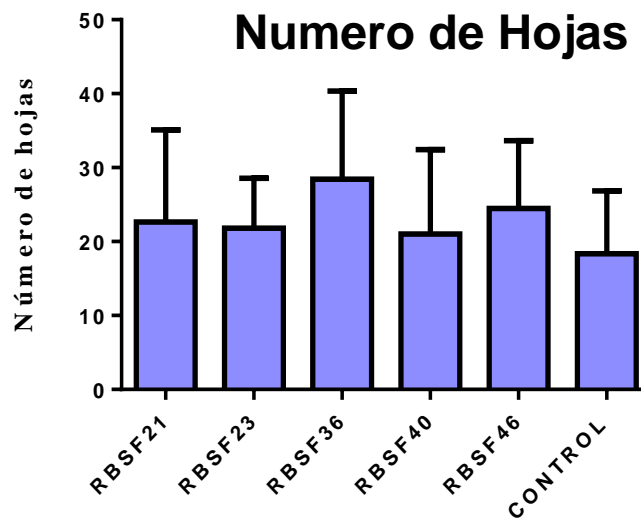
Resultados y Discusión

Análisis de datos estadísticos de varianza

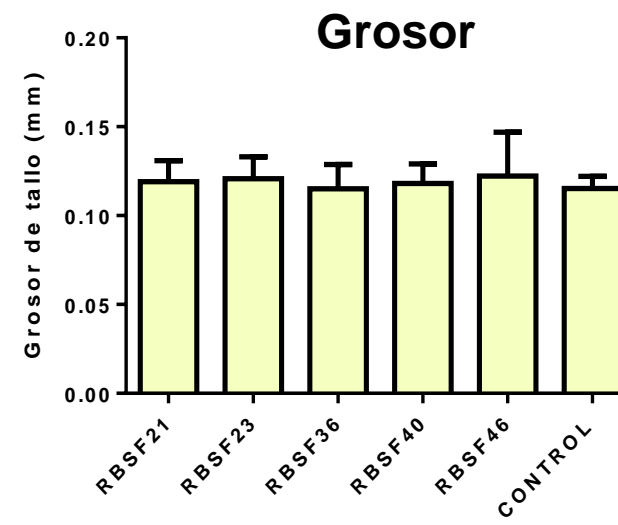
Raque (*Vallea stipularis*)



Cepas evaluadas



Cepas evaluadas



Cepas evaluadas

Efecto	Análisis de varianza de medidas repetidas Hipótesis efectiva de descomposición				
	SS	GRADO DE LIBERTAD	MS	F	p
Intercepta	59166,82	1	59166,82	755,0594	0,000000
Tratamiento	196,27	5	39,25	0,5009	0,772973
Error	2272,45	29	78,36		
TIEMPO	995,08	6	165,85	74,3685	0,000000
TIEMPO*Tratamiento	103,08	30	3,44	1,5407	0,045956
Error	388,03	174	2,23		

Efecto	Análisis de varianza de medidas repetidas Hipótesis efectiva de descomposición				
	SS	GRADO DE LIBERTAD	MS	F	p
Intercepta	119090,6	1	119090,6	215,6754	0,000000
Tratamiento	2639,9	5	528,0	0,9562	0,460456
Error	16013,1	29	552,2		
TIEMPO	18443,4	6	3073,9	57,9069	0,000000
TIEMPO*Tratamiento	2113,9	30	70,5	1,3274	0,133678
Error	9236,5	174	53,1		

Efecto	Análisis de varianza de medidas repetidas Hipótesis efectiva de descomposición				
	SS	GRADO DE LIBERTAD	MS	F	p
Intercepta	3,173278	1	3,173278	2120,222	0,000000
Tratamiento	0,004401	5	0,000880	0,588	0,709014
Error	0,043404	29	0,001497		
TIEMPO	0,005363	6	0,000894	11,132	0,000000
TIEMPO*Tratamiento	0,001942	30	0,000065	0,806	0,752398
Error	0,013970	174	0,000080		



CONCLUSIONES

La recuperación de RBSF

Suelos áridos,
erosionados y/o
afectados

VS

Suelo en Bosques Altos
andinos

1

La variedad morfológica
predominante
fenotípicamente

Bacilos Gram negativos

3

Las 18 cepas trabajadas 5
presentaron producción de AIA
entre 16 a 18µg/ml

5

Enterobacter cloacae

Rizobacterias

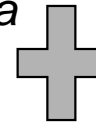
- Enterobacter cloacae*
- Pantoea agglomerans*

Concentraciones
AIA (18µg/ml)
IS >17%,

2

Escallonia paniculata

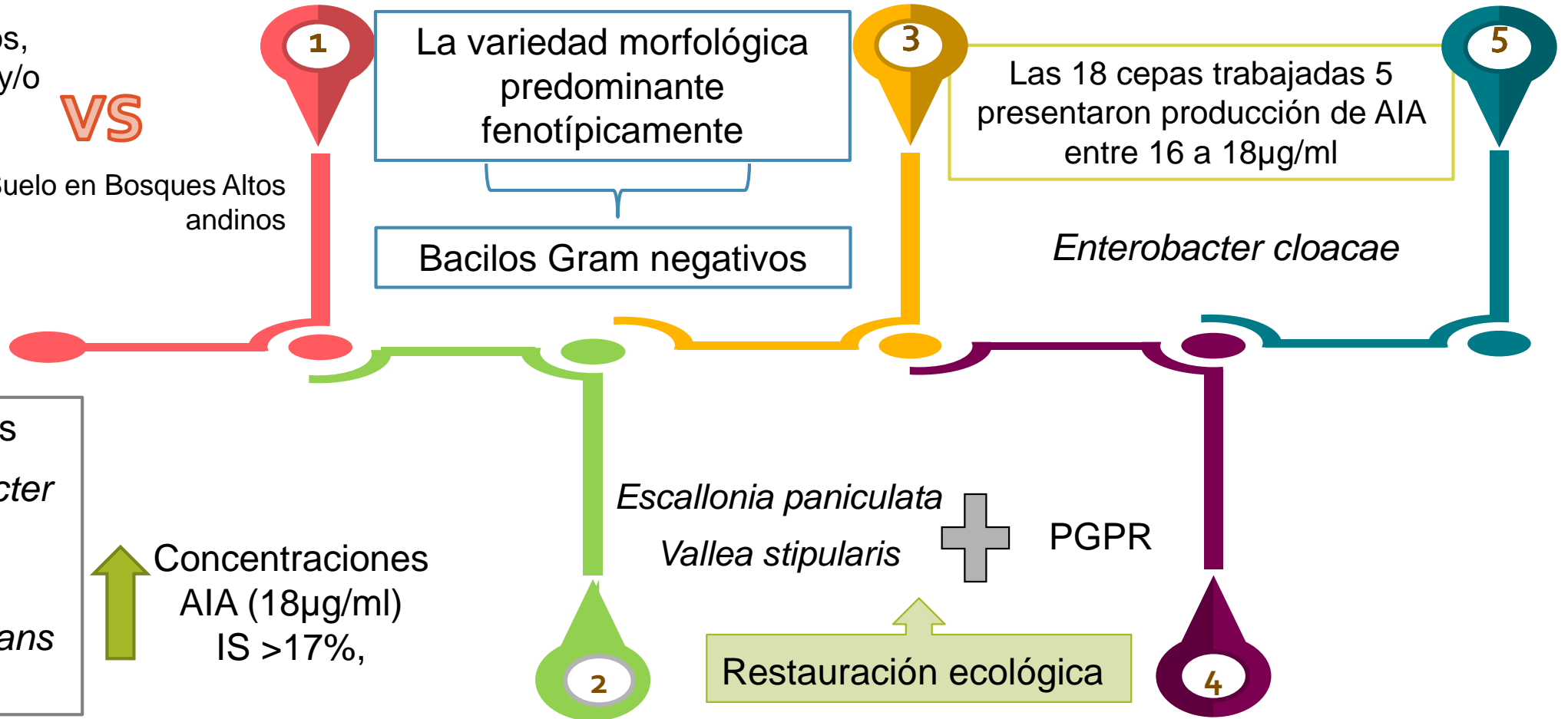
Vallea stipularis



PGPR

Restauración ecológica

4





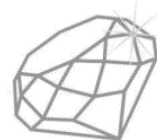
RECOMENDACIONES

- Reactivar previamente las cepas a las 24h antes de su valoración para evaluación productora de enzimas PGPR
- Realizar pruebas de antagonismo y simbiosis “in vitro” entre los microorganismos aislados para poder realizar posteriormente inóculos compuestos que puedan ser evaluados “in vivo” en las plantas Raque (*Vallea stipularis*) y Tibar (*Escallonia paniculata*)
- Identificar mediante técnicas moleculares las rizobacterias evaluadas
- Analizar las variables de crecimiento de las plantas “in vivo” en el vivero por un periodo de tiempo más amplio, teniendo en cuenta el ciclo de crecimiento de los árboles frente a rizobacterias PGPR



AGRADECIMIENTOS

- A nuestras asesoras Carolina Jaime, Graciela Lancheros y a nuestro asesor estadístico Camilo de los Ángeles por habernos guiado en este proceso, gracias por su tiempo y sus aportes a la realización de este trabajo de grado
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca porque a través de sus profesores nos dio las bases necesarias para hacer un buen trabajo
- A la Universidad Antonio Nariño, al Laboratorio de microbiología y nanotecnología de la sede tecnoparque SENA, por su tiempo y ayuda.



TecnoParque
COLOMBIA

Aplicación productiva del conocimiento y las nuevas tecnologías

UAN
UNIVERSIDAD
ANTONIO NARIÑO



REFERENCIAS

1. Velasco-Linares P, Vargas O. Problemática de los Bosques Altoandinos. Estrategias para la Restauración Ecológica del Bosque Altoandino [Internet]. 2008[citado el 16 de junio de 2016]; (Cavelier 1997):41–56. Disponible en: [http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/user_46/file/Guia Metodologica.pdf](http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/user_46/file/Guia%20Metodologica.pdf).
2. Benjumeda Muñoz. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones [Internet]. Universidad de Sevilla; 2017. Disponible en: [https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEAMU%C3%91OZ%2C DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEAMU%C3%91OZ%2C%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
3. Barea J, Navarro E, Montaya E. Production of Plant Growth Regulators by Rhizosphere Phosphate solubilizing Bacteria. J Appl Bacteriol [Internet]. 1976 [citado el 3 de junio de 2016]; 40(2):129–34. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com.scihub.cc/doi/10.1111/j.1365-2672.1976.tb04161.x/pdf>
4. Davison J. Plant Beneficial Bacteria. Nat Biotechnol [Internet]. 1988[citado el 5 de junio de 2016]; 6:709–12. Disponible en: <http://www.nature.com.scihub.cc/nbt/journal/v6/n3/full/nbt0388-282.html>
5. García, P. Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas. Rev del Inst Investig Trop. 2010;5(13):6376.
6. Osorno L. Evaluación de factores que afectan la bioacidulación de roca fosfórica bajo condiciones in vitro. Rev Colomb Biotechnol [Internet]. 2017;XIX(1):53– 62. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotechnologia/article/view/65968/pdf>
7. Ángulo V, Sanfuentes E, Rodríguez F, Sossa Ke. Rev argentina Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento. 2014;46(4):338–47
8. Rodríguez C, Hernández M. Aislamiento y Selección De Rizobacterias Promotoras De Crecimiento Vegetal En Cultivos De Uchuva (Physalis Peruviana L.) Con Capacidad Antagónica Frente A Fusarium Sp. 2009; 1–61. Gffgff
9. Nieto N, Szpinak V. Caracterización preliminar de la actividad microbiana solubilizadora de fosfato del biofertilizante Tierra Nueva [Internet]. Universidad ORT Uruguay. 2017. Disponible en: [https://dspace.ort.edu.uy/bitstream/handle/20.500.11968/3380/Material completo.pdf?sequence=-1&isAllowed=y](https://dspace.ort.edu.uy/bitstream/handle/20.500.11968/3380/Material%20completo.pdf?sequence=-1&isAllowed=y)
10. Beltrán Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica Cienc Tecnol Agropecu [internet].2014. [citado el 16 de junio de 2016];15(1):101–13. Disponible en: www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf
11. Walterson AM, Stavrínides J. Pantoea: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. FEMS Microbiology Reviews. 2015;39(6):968–984. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsre/article/39/6/968/547864>
12. Liliana S, Huertas P, Marcela M, Morales MB, Su Z, Casta DM, et al. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). 2006; 4:39–49
13. Beltrán Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica Cienc Tecnol Agropecu [internet].2014. [citado el 16 de junio de 2016];15(1):101–13. Disponible en: www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf
14. Gutiérrez Á M, Pérez J. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal Plant growth promoting rhizobacteria [Internet]. Universidad de la Laguna; 2017 [citado el 16 de junio de 2016] Disponible en: [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5766/Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5766/Rizobacterias%20promotoras%20del%20crecimiento%20vegetal.pdf?sequence=1&isAllowed=y)