



*Evaluación de Rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de
Bosque Alto Andino para uso en restauración ecológica del corredor
Chingaza-Sumapaz*

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
INFORME FINAL**

Bogotá D.C, Mayo de 2018



Evaluación de Rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de Bosque Alto Andino para uso en restauración ecológica del corredor Chingaza-Sumapaz

Autores:

Diana Milena Pérez Rodríguez

Jenssy Daniela Catama González

Asesores:

Ana Graciela Lancheros

Carolina Jaime Rodríguez

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
INFORME FINAL**

Bogotá D.C, Mayo de 2018

DEDICATORIA

A Dios, por darnos la oportunidad de vivir esta experiencia, por cruzar nuestros caminos y permitirnos salir de cada uno de los obstáculos que se nos presentan.

A nuestros padres, hermanos y familia por darnos siempre apoyo emocional, moral, económico y no dejarnos solas en este camino de la vida; enseñarnos a caminar por este sendero, ser fuertes y luchar por nuestros sueños.

A todas las personas que de una u otra forma estuvieron en el momento oportuno apoyándonos, dándonos su ayuda y compañía.

Jenssy y Diana

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecemos a Dios permitirnos culminar este proceso de aprendizaje y esta primera etapa de nuestras vidas

Agradecemos a nuestras familias y a todas las personas que durante toda nuestra vida han colaborado en nuestra formación tanto personal como profesional

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.

Nuestra gestora encargada Ahudrey Leal por haber confiado desde el principio en nuestras capacidades y habernos colaborado hasta el cansancio para que este trabajo de grado fuera una realidad.

A mi mejor amiga de la Universidad y compañera en el presente trabajo gracias por el apoyo incondicional siempre.

Jenssy y Diana

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
1. OBJETIVOS.....	15
1.1 Objetivo general.....	15
1.2 Objetivos específicos.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
3. MARCO TEÓRICO.....	23
3.1. Restauración ecológica.....	23
3.2. Bosque Alto Andino.....	24
3.3 Problemática de los Bosques Altos Andinos.....	26
3.4 Rizobacterias.....	27
3.5. El fósforo como nutriente y su importancia.....	29
3.6. Presentación del fósforo en el suelo.....	30
3.7. Ciclo de Fósforo.....	32
3.8. Solubilización de fosfato una nueva alternativa biológica.....	33
3.9 Enzimas Fosfatasas.....	37
3.10 Enzimas Fitasas.....	37
3.11 Banco de cepas.....	38
3.12 Screening microbiano.....	39
3.13 Viabilidad y pureza.....	40
3.14 Evaluación y técnicas de promotores del crecimiento vegetal (PGPR).....	40
3.15. Actividad Solubilizadora de Fósforo.....	41
3.16. Técnicas de Bioensayo en vivero.....	43
3.17 Árboles forestales uso en ensayos de restauración.....	43
3.17.1 Descripción vegetal.....	43
3.17.2 <i>Vallea stipularis</i>	44
3.17.3 <i>Escallonia paniculata</i>	46
4.1. Tipo de investigación y enfoque.....	48

4.1.1. Enfoque	48
4.2. Universo, población y muestra	48
4.2.1. Universo	48
4.2.2. Población.....	48
4.2.3. Muestra.....	48
4.3. Hipótesis, variables, indicadores	48
4.3.1. Hipótesis de investigación	48
4.3.2. Variables	49
4.3.3. Indicadores	49
4.4 Técnicas y procedimientos	49
4.4.1 Muestreo del suelo	49
4.4.2.1 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato	51
4.4.2.2 Screening de selección.....	52
4.4.2.3 Conservación de las cepas.....	52
4.4.2.3 Evaluación de Viabilidad y Pureza	52
4.4.2.4 Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfato.....	53
4.4.2.5 Ensayo de AIA (Ácido Indol Acético).....	54
4.4.2.6 Pruebas de identificación de PGPR	54
4.4.2.7 Realización de preinóculos y curva de crecimiento.....	55
4.4.2.8 Fase II. Evaluación de tratamientos inoculados a escala de vivero	55
4.4.2.9. Bioensayo a escala de vivero	56
4.4.2.10 Diseño del experimento en vivero	57
4.4.2.11 Análisis de datos	58
5. RESULTADOS	59
5.1 Fase I. Aislamiento y caracterización de rizobacterias solubilizadoras de fosfato.....	59
5.1.1 Codificación y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfato	66
5.1.2 Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfato	67
5.1.3 Ensayo de AIA (Ácido Indol Acético).....	69
5.1.4 Pruebas de identificación de microorganismos Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR).....	71
5.1.5 Fase II. Evaluación de tratamientos inoculados a escala de vivero inóculos y curva	73
5.1.6 Bioensayo en vivero.....	77
5.1.8 Análisis de datos estadísticos de varianza.....	82

5.1.8.1	Altura Tibar (<i>Escallonia paniculata</i>)	82
5.1.8.2	Número de hojas planta Tibar (<i>Escallonia paniculata</i>)	84
5.1.8.3	Grosor del tallo planta Tibar (<i>Escallonia paniculata</i>)	86
5.1.8.4	Altura planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>)	88
5.1.8.5	Número de hojas planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>)	90
5.1.8.6	Grosor de tallo planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>)	92
6.	DISCUSIÓN.....	94
7.	CONCLUSIONES.....	99
8.	RECOMENDACIONES	100
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	ANEXOS.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del fosforo.....	31
Figura 2. Ácidos orgánicos alifáticos producidos por bacterias solubilizadoras de fosfato.....	35
Figura 3. Ubicación área de estudio, Corredor Chingaza-Sumapaz, Sede Usme UA.....	49
Figura 4. Ubicación astronómica del Bosque Alto Andino, Sede Usme UAN.....	49
Figura 5. Visualización modelo de trabajo de tratamientos y controles de plantas según cantidad, Especie # 1.	56
Figura 6. Visualización modelo de trabajo de tratamientos y controles de plantas según cantidad, Especie # 2.	57
Figura 7. Caracterización morfológica en el medio PSM para el muestreo #1	60
Figura 8. Caracterización morfológica en el medio SMRS-1 para el muestreo #1.....	60
Figura 9. Caracterización morfológica en el medio PSM diluciones 10^{-3} y 10^{-4} para el muestreo #2.....	61
Figura 10. Caracterización morfológica en el medio SMRS-1 para el muestreo # 2.....	62
Figura 11. Caracterización morfológica en el medio Pikovskaya para el muestreo # 2.....	63
Figura 12. Resultados actividad solubilizadora de fosfatos. A. Control Negativo, B. Control Positivo, C. Cepa evaluada. Derecha: Cepa BSFN 36. Izquierda: Cepa BSFN 23.....	66
Figura 13. Índice de solubilización de las cepas trabajadas y controles en medio NBRIP.....	67
Figura 14. A. Curva de calibración ensayo AIA B. Concentraciones de AIA (Ácido Indol Acético) en las cepas evaluadas C. Absorbancia de cepas evaluadas con producción de AIA....	69
Figura 15. Identificación de las cepas RBSF 21, RBSF 23, RBSF 36, RBSF 40 y RBSF 46 por sistema BBL™ Crystal™ y MicroScan WalkAway plus.....	70
Figura 16. Curva de crecimiento cepa RBSF 21.....	72
Figura 17. Curva de crecimiento cepa RBSF 23.....	72
Figura 18. Curva de crecimiento cepa RBSF 37.....	73
Figura 19. Curva de crecimiento cepa RBSF 40.....	73
Figura 20. Curva de crecimiento cepa RBSF 46.....	74
Figura 21. Comparación Curvas de crecimiento cepa de RBSF con capacidad PGPR.....	75
Figura 22. Preparación de los inóculos para los tratamientos.....	75
Figura 23. Inoculación de las plantas según los tratamientos.....	76
Figura 24. Tiempo 0 (A, B), Tiempo 1 (C-D) y Tiempo 2 (E-F) de los 5 tratamientos A,C,E Raque, B,D,F Tibar.....	76
Figura 25. Tiempo 3 (A,B), Tiempo 4 (C-D),Tiempo 5 (C-D) y Tiempo 6 (C-D) de los 5 tratamientos A-C Raque, B-D Tibar.....	78
Figura 26. Enrollamiento hojas control 6 para Tibar, Tiempo 2(A),3(B),4(C); D Tiempo 4 cepa RBSF 21 planta Raque.....	78
Figura 27. Análisis estadístico Altura planta Tibar (<i>Escallonia paniculata</i>). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.....	79
Figura 28. Análisis estadístico Altura planta Tibar (<i>Escallonia paniculata</i>). Gráfico y tabla de varianza para Altura a lo largo del tiempo entre los diferentes tratamientos y control.....	80
Figura 29. Análisis estadístico Número de hojas planta Tibar (<i>Escallonia paniculata</i>). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.....	81
Figura 30. Análisis estadístico Número de hojas planta Tibar (<i>Escallonia paniculata</i>). Gráfico de	

varianza para número de hojas a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control.....	82
Figura 31. Análisis estadístico Número de hojas planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>). A Gráfico de medidas repetidas tratamientos evaluados y control. B Gráfico de varianza cepas evaluadas en el tiempo y control. C. Tablas de análisis de varianza.....	83
Figura 32. Análisis estadístico Grosor tallo planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>). A Gráfico de medidas repetidas tratamientos evaluados y control. B Gráfico de varianza cepas evaluadas en el tiempo y control. C. Tablas de análisis de varianza.....	84
Figura 33. Análisis estadístico Altura planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.....	85
Figura 34 Análisis estadístico Altura planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>) A Gráfico de varianza para Altura a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. B Tabla de análisis de varianza.....	86
Figura 35. Análisis estadístico Número de hojas planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.....	87
Figura 36. Análisis estadístico Número de hojas planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>). Gráfico de varianza para número de hojas a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. B. Tabla de análisis de varianza.....	88
Figura 37. Análisis estadístico Grosor de tallo planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.....	89
Figura 38. Análisis estadístico Grosor del tallo planta Raque (<i>Vallea stipularis</i>) A Gráfico de varianza para grosor de tallo a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. B. Tabla de análisis de varianza.....	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Formas de fósforo inorgánico en el suelo.....	30
Tabla 2. Principales procesos microbianos involucrados en la solubilización de fosfatos.....	32
Tabla 3. Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP).....	35
Tabla 4. Tablas número de cepas aisladas según medios y diluciones.....	58
Tabla 5. Tablas número de UFC según número de muestro.....	59
Tabla 6. Tabla descripción de dilución aislada por medio muestreo #1.....	59
Tabla 7. Tabla UFC de la dilución aislada por medio muestreo #2.....	61
Tabla 8. Tabla número de UFC medio SMRS-1 muestreo #2.....	62
Tabla 9. Tablas número de cepas aisladas con su respectiva codificación para el banco de cepas del Nodo Tecnoparque.....	63
Tabla 10. Tabla codificación de cepas seleccionadas en el primer screening.....	65
Tabla 11. Tamaño de los halos de solubilización e índice de solubilización.....	66

RESUMEN

En Colombia se ha reconocido el uso inadecuado de los suelos moderadamente fértiles localizados en zonas urbanas, donde la técnica agrícola es la base principal de explotación y sustento diario; a su vez el uso indiscriminado de pesticidas, herbicida y fertilizantes han contribuido a la erosión y daño progresivo del suelo. Es allí donde nace la necesidad de implementar herramientas para la conservación y preservación de ecosistemas, método que actualmente se conoce como restauración ecológica.

El propósito del presente proyecto es la evaluación de rizobacterias solubilizadoras de fosfato con capacidad PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) aisladas del suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) y de Bosque Alto Andino, en medios de cultivo selectivos identificados como SMRS-1, PSM y Pikovskaya con el objetivo de usarlas en el crecimiento de las plantas Tibar (*Escallonia paniculata*) y Raque (*Vallea stipularis*) usadas frecuentemente para restauración ecológica.

Se lograron aislar 44 cepas, las cuales se clasificaron mediante pruebas cualitativas (método fosfatasas) y cuantitativas (producción AIA (Ácido indol acético)) para identificar su actividad PGPR, se usaron en la preparación del inóculo el cual posteriormente se utilizó sobre las plantas Tibar (*Escallonia paniculata*) y Raque (*Vallea stipularis*) bajo condición de vivero reconociendo la capacidad de estimular el crecimiento y desarrollo de la población vegetal, evaluado a partir del uso de variables (altura, número hojas y grosor tallo) analizadas por medio del método estadístico de varianza simple ANOVA. Los microorganismos fueron identificados como *E. cloacae*, *P. agglomerans* y *S. marcescens*.

Palabras clave: Restauración, Fosfatasas, Rizobacterias, solubilización, inóculo.

INTRODUCCIÓN

La restauración ecológica busca la recuperación de un ecosistema que ha sido degradado por diferentes factores físicos, químicos y/o ambientales. El suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) ubicado en la ciudad de Bogotá D.C, ha sufrido alteraciones a causa de la erosión, quemas, cambio climático y cultivos agrícolas, lo que implica la pérdida de una gran variedad de microorganismos que favorecen la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

Debido a la ausencia de microorganismos, pérdida de componentes y propiedades, el suelo se ve condenado a ser cada vez más estéril, por esta razón surge la necesidad de introducir nuevos insumos, aquellos que sean capaces de ayudar a su restauración y/o a la rehabilitación.

Se ha indagado en la búsqueda de alternativas para la recuperación de estos terrenos a través de la implementación de plantas y microorganismos nativos que trabajen en conjunto; puesto que poseen las características propias del ambiente, como la capacidad solubilizadora de fósforo permitiendo la transformación del elemento de fósforo y el aprovechamiento del mismo presente en el suelo por parte de la planta, convirtiéndose en un intermediario entre los factores nutricionales del suelo y la absorción de estos por las mismas.

El presente estudio se basó en el uso de rizobacterias solubilizadoras de fósforo identificadas como (*Enterobacter cloacae* y *Pantoea agglomerans*) con capacidad PGPR en conjunto con especies de plantas nativas utilizadas en restauración ecológica; se desarrolló a escala de vivero como primer acercamiento *in vivo* del comportamiento y adaptación vegetal a inóculos bacterianos como posibles biofertilizantes.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Evaluar rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de suelos del Bosque Alto Andino y de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) con capacidad PGPR a escala de vivero para posible uso en restauración ecológica.

1.2 Objetivos específicos

1. Aislar rizobacterias nativas del Bosque Alto Andino y suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) con capacidad solubilizadora de fosfato para uso en restauración ecológica.

2. Caracterizar fenotípica y enzimáticamente los rizobacterias solubilizadores de fosfato con potencial biotecnológico hallados en el Bosque Alto Andino y suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) para uso en restauración ecológica

3. Reconocer las rizobacterias con capacidad productora de fitohormonas para promover el crecimiento vegetal de las especies nativas Tibar (*Escallonia paniculata*) y Raque (*Vallea stipularis*) como uso en restauración ecológica.

4. Identificar las rizobacterias nativas aisladas del Bosque Alto Andino y del suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) con capacidad solubilizadora de fosfato para uso en restauración ecológica.

5. Demostrar por medio de ensayos preliminares a escala de vivero la actividad promotora de crecimiento vegetal en plantas de Tibar (*Escallonia paniculata*) y Raque (*Vallea stipularis*) inoculadas con las rizobacterias identificadas.

2. ANTECEDENTES

Actualmente la degradación de los bosques ha generado una reducción masiva a nivel vegetal, inhabilidad de ecosistemas y pérdida de diversidad biótica y abiótica, lo que ha llevado a la creación de alternativas como la restauración ecológica planteada desde 1993 por Harper como ciencia emergente con una profunda importancia en conservación biológica (1).

Con el tiempo se han empleado diferentes descripciones del término “restauración”, la SER (Sociedad de Restauración Ecológica) define la restauración ecológica como "El proceso de alterar intencionalmente un sitio para establecer un ecosistema", reconociendo que la meta de este proceso es imitar la estructura, función, diversidad y dinámica del ecosistema específico a restaurar. Pero según National Research Council, es el proceso de asistir el recubrimiento de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido teniendo como objetivo el restablecimiento de la función y la estructura de las áreas que han sido disturbadas, utilizando como referencia los ecosistemas (2,3).

Según Barrera y Valdés en el mundo los temas de la restauración ecológica y ecología de la restauración, comenzaron a ser desarrollados a finales de la década de los ochenta del siglo XX por investigadores como Jordan, Cairns, Bradshaw y Harper; pero su desarrollo más importante fue dado, durante la década de los noventa con el nacimiento de la SER. Para la misma época en Colombia, inicia la rápida extensión de los cultivos ilícitos convirtiéndose en una fuente importante para la pérdida de bosques en algunas zonas del país, pero para la década de los años 90's toma fuerza la idea de la necesidad, no solo de la conservación sino también de la reparación o remediación de los daños ambientales causados por las actividades humanas (3).

Para mediados de la década de los noventa el tema continuó trabajando, la Fundación Bachaqueros fueron los primeros en dar pasos frente a la problemática, pero a finales de esa

década, la idea empieza a ponerse de costumbre y a ser promovido mediante cursos y seminarios organizados por diferentes instituciones. Así que, para finales del siglo, el 45 % de los ecosistemas naturales terrestres de Colombia habían sido transformados por la ganadería, la agricultura o la expansión urbana. (4)

De esta forma la restauración ecológica surge como una actividad humana necesaria para contrarrestar de alguna manera los efectos negativos que se han ido acumulando a través del tiempo, necesaria cuando los procesos de regeneración natural de los ecosistemas degradados son insuficientes o demasiado lentos para la recuperación de los mismos, es decir, cuando ocurren en el transcurso de varias décadas. Para el 2013 la primera presentación escrita del Plan Nacional de Restauración, Restauración Ecológica, Rehabilitación y recuperación de áreas disturbadas como documento del Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible de Colombia y el desarrollo de una iniciativa de planificación en el tema. (3,5)

El origen de la restauración ecológica se puede ubicar a principios del siglo XX en Estados Unidos descrito por Murcia y Guariguata (5), cuando Aldo Leopold a mediados de 1934 dijo en su discurso de dedicación del Arboretum de la Universidad de Wisconsin “Ha llegado el momento de que la ciencia se ocupe de la tierra. Reconstruyendo una muestra de lo que teníamos en un principio, así que para el 2000 la Comisión de Manejo de Ecosistemas de la IUCN (International Union for Conservation of Nature) incluyó la restauración ecológica dentro de su estrategia de conservación de la biodiversidad de manera amplia.(6)

Los Bosques Altos andinos constituyen un importante recurso florístico en el país, estos han venido cambiando a través del tiempo por diferentes factores del entorno. En Galindo mencionan que el conocimiento sobre la flora y la vegetación de las montañas andina se han incrementado durante los últimos años llegando a ser reconocidas como uno de los principales

centros de diversidad y especiación en el mundo. Sin embargo, estos bosques han estado en constante cambio gracias a la expansión de las fronteras agropecuarias. Además, varios estudios sugieren que en Colombia queda menos del 10% de los bosques andinos originales y menos del 5% de los bosques altos andinos. (7)

Según estudios de Cavelier refiere que, como parte de los procesos de deforestación, la mayoría de los bosques maduros montañosos en Colombia, en particular los bosques alto andinos (ca. 2500- ca. 3200 m.s.n.m), fueron utilizados a partir de la década de los años 50 para la producción de carbón vegetal y posteriormente para la adecuación de pastizales para la ganadería de altura; además de esto también se han usado para la siembra de cultivos ilícitos lo cual ha conllevado a grandes cambios en la composición del suelo como de su microbiota. (7,8)

Para Vargas los bosques Altos andinos se encuentran de 3000 a 3200 m., se caracterizan por una vegetación compuesta especialmente por *Weinmannia sp.* (encenillo), *Ilex sp.*, *Hesperomeles sp.* (mortiño), *Miconia sp.* (tuno), *Brunnellia sp.*, *Clusia sp.* (cucharo), *Befaria sp.* (pegamosco), entre otras, estos han sufrido varios cambios por las diferentes actividades que se realizan en su entorno como algunas actividades de pastoreo. (3)

Las plantaciones forestales de especies introducidas se iniciaron en Colombia a mediados del siglo XX como una alternativa económica que buscaba convertir al país en una potencia forestal, estas plantaciones se han convertido en un problema para las especies nativas, ya que compiten entre ellas por la supervivencia alterando así a la conformación natural y restauración del ecosistema. (6)

De acuerdo con Avella uno de los núcleos más interesantes de Bosque Alto Andino en la cordillera Oriental se localiza en los alrededores de la Sabana de Bogotá y comprende desde el

macizo de Chingaza al nororiente hasta el macizo de Sumapaz al suroccidente; estos ecosistemas proporcionan bienestar y vivienda a una buena parte de la población y son cruciales en la regulación de los ciclos hídricos. (9)

La promoción de crecimiento vegetal a partir de uso de PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria), con la función de solubilización de fosfato como alternativa en usos de restauración ecológica ha impulsado la integración de nuevos métodos y avances para la repoblación de bosques y/o terrenos de forma nativa e innata para el ambiente; siendo las Rizobacterias microorganismos que tienen la capacidad de colonizar las raíces vegetales. (10)

Así data un estudio en 1976 con investigadores en el tema como Azon y Barea, iniciando con el desarrollo de trabajos adicionales utilizando inoculantes de bacterias solubilizadoras de fosfato con fosfato de roca escasamente soluble añadida al suelo; mostraron que las bacterias mejoraron la relación raíz / brote en las plantas de lavanda (*lavandula sp.*) y aumentando el peso seco de las mismas proporcionalmente con la cantidad de fosfato de roca. Así que en Barea, Navarro y Montoya (9), se generaban dudas acerca de la capacidad de las bacterias para solubilizar complejos fósforo inorgánicos o utilizar fosfatos orgánicos para aumentar la reserva total de fósforo soluble en el suelo, pero para 1976 los autores finalizaron su estudio determinando 108 cepas bacterianas con capacidad solubilizadora destacando los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aerobacter*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Micrococcus* y *Agrobacterium*.

Para 1988, John Davison resalta que las bacterias asociadas a la rizosfera de las plantas son capaces de promover el crecimiento vegetal con el aporte de nutrientes y factores de crecimiento, surgiendo la idea en la creación de biofertilizantes como nueva herramienta de estimulación para esta época y actualmente; se indicó que existen efectos benéficos indirectos en

este tipo de colonización como el antagonismo a fitopatógenos y el uso de la ingeniería genética en los mecanismos de inhibición. Se ha considerado como factores directos la solubilización de fosfato y la capacidad de síntesis de fitohormonas que han favorecido el crecimiento vegetal; en Brown, 1972 se mostró que las bacterias pueden producir más de una sustancia con actividad fitohormonal en medios de cultivos que disuelven el fosfato, siendo estas auxinas, giberelinas y citoquinas. (10,11)

El desarrollo científico en el tema ha llevado a que estudios se centren en reconocer microorganismos como *Pseudomonas spp.*, en uno de los principales géneros PGPR; un ejemplo descrito en Lemanceau, demostró que una cepa de *P. putida* aumentó significativamente la nodulación de leguminosas, debido a su capacidad de síntesis de metabolitos específicos tales como sideróforos, antibióticos, factores de crecimiento, lipopolisacáridos, etc, con influencia vegetal en el mejoramiento de la germinación (12).

Para 1980 se consideró al fósforo después del nitrógeno, como el nutriente inorgánico más requerido por las plantas y microorganismos; en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas orgánicas como inorgánicas, por dichas razones se consideró que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (13).

Procedimientos como la determinación semicuantitativa de la capacidad solubilizadora de fosfatos de microorganismos llevados a cabo en 1999 por Rodríguez, fueron posibles utilizando métodos de visualización en placa que mostraron zonas de limpieza alrededor de las colonias microbianas en medios que contienen fosfatos minerales insolubles (principalmente fosfato tricálcico o hidroxiapatita) como única fuente de fósforo. En algunos casos, se han descrito

resultados contradictorios entre el halo de las placas de detección y la solubilización de fosfato en cultivos líquidos, sin embargo el método se pudo considerar como fiable para el aislamiento y la caracterización preliminar de microorganismos solubilizadores de fosfato, posteriormente modificado y mejorado utilizando azul de bromofenol como indicador para la visualización de halos de color amarillo alrededor de las colonias en respuesta a la caída de pH producida por la liberación de ácidos orgánicos, responsables de la solubilización del fosfato. (13)

Adicionalmente Fernández mencionó que para 1988, Gyaneshwar y col. demostraron que algunos microorganismos que solubilizan fósforo en condiciones de laboratorio no son capaces de hacerlo en vertisoles alcalinos. Esta incapacidad se debe posiblemente al alto poder de resistencia a los cambios de pH de los suelos alcalinos junto con la baja secreción de ácidos orgánicos que producen los microorganismos en estos ambientes; así que para 2002 determinaron que es mejor adoptar técnicas de selección de cepas a partir de ensayos que reflejen la capacidad amortiguadora de pH del suelo y por lo tanto serían válidos sólo aquellos métodos que incorporen soluciones tamponadas a los medios de cultivo. De todas maneras, sólo los ensayos de campo, establecerán si la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico de los organismos seleccionados *in vitro* realmente tiene efecto sobre plantas de interés comercial. (12)

Las bacterias rizosféricas desempeñan una función importante al establecer asociaciones con las plantas. En base al efecto que ejercen estos microorganismos sobre el crecimiento de las plantas, éstas pueden clasificarse en tres grupos: benéficas, neutras y patógenas según Beneduzi, aunque Kloeppler & Schroth para 1978 introdujeron el término de rizobacterias en sus experimentos con rábanos, definiéndolo como la comunidad bacteriana que coloniza competitivamente las raíces de la planta, que estimulan su crecimiento y reducen la incidencia de las enfermedades, posteriormente designaron a este grupo bacteriano como rizobacterias

promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria). (14)

El uso de rizobacterias a través de los años ha permitido reconocer que una alternativa para recuperar el componente biótico de los suelos y lograr una producción vegetal ha sido considerar su capacidad como promotoras del crecimiento llamadas PGPR (Plant growth promoting rizobacterias), bien directamente mediante la secreción de hormonas o indirectamente inhibiendo organismos fitopatógenos o mejorando la asimilación de las fuentes minerales. (15)

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Restauración ecológica

La Sociedad para la Restauración Ecológica (SER, 2002) define restauración ecológica como “el proceso de asistencia a la recuperación de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido”.

Según Jackson (1993), la Sociedad de Restauración Ecológica, define la restauración ecológica como " El proceso de alterar intencionalmente un sitio para establecer un ecosistema". La meta de este proceso es imitar la estructura, función, diversidad y dinámica del ecosistema específico a restaurar (1).

Existen tres formas básicas de restaurar un área degradada (Machlis 1993):

- **Recuperarla:** Volviendo a cubrir de vegetación la tierra con especies apropiadas,
- **Rehabilitarla:** Usando una mezcla de especies nativas y exóticas para recuperar el área,
- **Restaurarla:** Restableciendo en el lugar el conjunto original de plantas y animales con aproximadamente la misma población que antes (1).

Aunque hubo esfuerzos pioneros desde mediados del siglo XX, no fue sino hasta el año 2002 cuando se iniciaron diferentes proyectos. En 1951, el Congreso de la República aprobó la Ley 4, que declara de utilidad pública una zona aledaña al río Otún y sus afluentes (en el municipio de Pereira, Risaralda) y ordenó destinarla exclusivamente a la repoblación forestal o a la formación de bosques industriales.

El objetivo era asegurar el suministro de agua al municipio de Pereira y alrededores. Para

tal efecto, se establecieron aproximadamente 840 hectáreas de plantaciones monoespecíficas de árboles nativos (principalmente *Alnus acuminata* y *Quercus humboldtii* y en menor grado *Podocarpus montana*) y exóticos (principalmente *Pinus patula* y *Fraxinus chinensis*, y en menor grado *Cupressus lusitanica* y cuatro especies de *Eucalyptus* y *Pinus* respectivamente) en parte del área deforestada. El resto se dejó regenerar naturalmente (Posada y Vanegas 1981). Aunque los protocolos de siembra y manejo inicial seguían un esquema industrial, solo un área muy pequeña de estas plantaciones fue aprovechada comercialmente al turno de corta de 20 años (Posada & Vanegas 1981).

El resto, fue colonizado por la vegetación remanente. Eventualmente la zona se designó en dos áreas protegidas (el Parque Natural Regional Ucumarí, y el Santuario de Fauna y Flora Otún Quimbaya) que hoy constituyen parte de la zona de amortiguación del Parque Natural Nacional Los Nevados. Hoy en día el río Otún surte de agua a más de dos millones de habitantes y los bosques plantados han catalizado la recuperación de la fauna y la flora de la región (Kattan y Murcia 2012), incluyendo la recuperación de varias especies muy amenazadas de aves, tales como tres especies de hormigueros (*Grallaria spp.*) y una de pava (*Penelope perspicax*) (Kattan y Beltrán 1999, Kattan et al. 2006) y de árboles.

3.2. Bosque Alto Andino

Son ecosistemas de alta montaña se ubican desde los 2800 metros de altitud y comprenden los bosques altos andinos entre los 3200 m y 3400 m y el páramo que va hasta los 4700 m. De acuerdo con Rangel, en la región paramuna de Colombia la franja con mayor expresión de la riqueza es la transición Alto Andino-subpáramo con 2385 especies de 487 géneros y 115 familias. Se consideran como los ambientes de montaña más ricos en especies y

géneros del mundo en comparación con otras floras de alta montaña, y presentan en general una disminución en la riqueza y diversidad a medida que aumenta el gradiente altitudinal. Estos ecosistemas proporcionan bienestar y vivienda a una buena parte de la población y son cruciales en la regulación de los ciclos hídricos y de los caudales de las corrientes (8,16). Aunque a nivel nacional se reconoce la importancia de los páramos por los servicios ecosistémicos que prestan a la sociedad, el crecimiento acelerado de las grandes ciudades, el incremento de la población y la ampliación de la frontera agropecuaria amenazan con perturbar el equilibrio dinámico del ciclo hídrico en estos ecosistemas.

De acuerdo con Avella uno de los núcleos más interesantes de páramo en la cordillera Oriental se localiza en los alrededores de la Sabana de Bogotá y comprende desde el macizo de Chingaza al nororiente hasta el macizo de Sumapaz al suroccidente. (8)

La principal vegetación de los Andes y su composición florística son el producto de gran variedad de factores que han interactuado a través del tiempo. Particularmente, el levantamiento final de los Andes trajo consigo la aparición de ambientes con características que brindaron oportunidades excepcionales para los procesos de especiación y adaptación. Por otra parte, los cambios climáticos ocurridos durante el cuaternario afectaron profundamente la composición y la estructura de la vegetación de la selva andina, produciéndose migraciones repetidas de elementos florísticos provenientes de las regiones templadas de los continentes (16,17)

El bosque Alto Andino es la franja de vegetación que va desde los 3000 a 3200 m. Se caracteriza por una vegetación compuesta especialmente por *Weinmannia sp.* (encenillo), *Ilex sp.*, *Hesperomeles sp.* (mortiño), *Miconia sp.* (tuno), *Brunnellia sp.*, *Clusia sp.* (cucharo), *Befaria sp.* (pegamosco) entre otras, con elementos arbóreos hasta de 25 m de altura. Presenta nubosidad y niebla con temperaturas promedio de 15 a 60°C, condiciones ambientales extremas: baja

presión atmosférica, escasa densidad del aire, baja temperatura media. El factor característico de estos bosques es la alta humedad atmosférica ya que por su ubicación en zonas donde el aire caliente y saturado de vapor de las zonas bajas se condensa y produce nubosidad. Esta característica de interceptar la neblina juega un papel importante en la regulación del ciclo hidrológico, aumentando los niveles de escorrentía, proporcionando un aporte importante de agua, donde en algunos puede llegar al 48% (3,17)

Clima

El área tiene una precipitación media anual de 765,2 mm y una temperatura promedio anual de 9.2 °C, con oscilaciones promedio diarias entre 0.8 °C y 5.8°C. El régimen de lluvias es bimodal donde la época de mayor precipitación va desde abril hasta julio y la de menor de septiembre a noviembre. Los meses más secos van de diciembre a febrero, en los cuales se presenta la menor precipitación promedio entre 19,2 mm y 34,2 mm. La evapotranspiración se mantiene relativamente constante durante todo el año, con una variación de 10,47 (18).

3.3 Problemática de los Bosques Altos Andinos

Actualmente en Colombia los bosques son las zonas más afectadas por la presión colonizadora urbana con altas tasas de deforestación desde el año 1800 hasta nuestros días, se ha evidenciado la transformación de un 70 a 90% de la región andina debido al consumo de leña, la alta densidad poblacional y alta presión sobre la tierra con diferentes disturbios con fines de agricultura (cultivos de papa principalmente), ganadería o una utilización escalonada de estas dos prácticas, procesos industriales de explotación masiva de algún recurso como la explotación de madera, quemadas continuas para preparar el terreno para el cultivo, entre muchas otras prácticas que permanecen activas hasta la fecha.(19)

Esto ha traído consigo la disminución en la cobertura vegetal del bosque, cambios en la estructura de las especies y en la complejidad del ecosistema al tiempo que se produce un impacto en la función que éste cumple.

Por estas razones los bosques alto andinos se consideran como uno de los ecosistemas más amenazados, identificando las principales problemáticas que se presentan como consecuencia del deterioro de los ecosistemas alto andinos tenemos: la pérdida y fragmentación del hábitat, la potrerización, la paramización, las plantaciones forestales de exóticas, las invasiones de plantas exóticas o nativas y la erosión. (19)

3.4 Rizobacterias

Se ha denominado, rizobacterias a las bacterias que viven en las inmediaciones de las raíces de las plantas, es decir, la rizosfera. Estas bacterias constituyen un grupo formado por multitud de especies, algunas de las cuales tienen efectos beneficiosos sobre el desarrollo de las plantas mediante diversos mecanismos, recibiendo por ello el nombre de PGPR (Plants Growth Promoting Rhizobacteria). Por tanto, para hablar de sus características y diferentes efectos en el desarrollo de las plantas, se debe definir primero cómo se comportan en relación con el espacio de suelo que supone la rizosfera y los demás microorganismos presentes en él.

Estas colonizan la zona rizosférica debido a que le proporciona una gran cantidad de nutrientes gracias a los exudados de las raíces de las plantas, tratándose por tanto de un ambiente muy rico que satisface la mayoría de las necesidades que requieren las bacterias para desarrollarse. Sin embargo, por esta misma razón, este ambiente es propenso a facilitar la colonización por parte de otros grupos de bacterias y microorganismos que pueden ser

fitopatógenos, u otros que no tengan efectos de ningún tipo sobre las plantas, pero que, por relaciones de competición, comprometen el desarrollo de las rizobacterias que si son beneficiosas para la planta. Por tanto, para que las rizobacterias logren proliferar en la rizosfera deben poseer diversos mecanismos que favorezcan la competencia. (20)

Entre estos mecanismos podemos encontrar los movimientos quimiotácticos o la producción de compuestos con actividad antibiótica frente a otros posibles colonizadores de la raíz. Las rizobacterias son muy variadas, así como sus propiedades, las funciones que llevan a cabo y los fines con los que se pueden comercializar. Según los fines comerciales, las PGPR se pueden clasificar según Bhattacharyya & Jha (2012) (20):

1. El uso a modo de biofertilizadores, como preparados comerciales que contienen microorganismos vivos que se pueden inocular en las semillas, en la superficie de la planta o en el suelo. Al colonizar las distintas partes de las mismas, estimulan el rendimiento y crecimiento vegetal. Algunos de los mecanismos por lo que actúan son la fijación del nitrógeno, que puede llevarse a cabo en forma de vida libre, (como por ejemplo los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Azospirillum*), o en simbiosis (como por ejemplo los géneros *Frankia* o *Rhizobium*).

2. Como bioestimulantes, formulaciones comerciales compuestas por microorganismos con la capacidad de producir fitohormonas, que pueden ser ácido indol acético, etileno, giberelinas, etc.

3. Finalmente, como biopesticidas en las tareas de biocontrol, un campo que empieza a emerger como sustitutivo de los pesticidas químicos y sintéticos. Los mecanismos que se recogen dentro de los biopesticidas son varios: la producción de antibióticos, sideróforos, o enzimas hidrolíticas que impiden la colonización de las

plantas por microorganismos patógenos. Los grupos de bacterias que poseen estas capacidades son múltiples, especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterobacter* o *Azospirillum* son algunos de los ejemplos más comunes de bacterias con capacidad de biocontrol.

Este uso a nivel comercial va determinado en mayor interés a la clasificación de los distintos mecanismos que emplean las PGPR para promover el crecimiento vegetal. Además, estos mecanismos se pueden clasificar según favorezcan a las plantas de forma directa como bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilización del fósforo, producción de fitohormonas y sideróforos, o de forma indirecta como la capacidad de biocontrol y la producción de enzimas líticas frente a microorganismos fitopatógenos.

En general la coexistencia de los microorganismos en el suelo se dará por su habilidad de competencia por los nutrientes de la rizósfera que genera interacciones microbianas acordes al metabolismo de la planta debido a la liberación de sustancias difusantes, secreciones, lisados, gases y mucílago. Así mismo, el establecimiento de poblaciones competitivas de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas depende principalmente de aspectos puntuales como la colonización rizosférica de la planta, la capacidad de respuesta genética y quimioatrayente del microorganismo hacia la rizósfera (21).

3.5. El fósforo como nutriente y su importancia

En los suelos “la disponibilidad del fósforo (P) es esencial para el crecimiento vegetal porque constituye más de 0,2% del peso seco de la planta” (22). “Las plantas adquieren el fosfato a partir de la solución del suelo en forma inorgánica en estado soluble como fosfatos mono y dibásicos, siendo necesario un pH de 6,5 para que el ion ortofosfato en el suelo sea aprovechable

por las plantas, dado que a ese pH la precipitación de los fosfatos de aluminio y calcio disminuye”.

Es el nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas, el cual cumple una función específica en cada una de ellas fortaleciendo sus componentes, pero este no está disponible en el suelo para su utilización por parte de ellas y es necesario la ayuda de microorganismos solubilizadores para ser asimilado por ellas. Las bacterias solubilizadoras de fosfato tienen la capacidad de movilizar el fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces de las plantas estas a su vez le suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (24).

En diferentes ecosistemas la reserva de fósforo se encuentra en las rocas, unido al oxígeno formando fosfatos. Cuando las rocas están expuestas al ambiente, la intemperie y la lluvia, estos fosfatos se disuelven, de tal forma que son absorbidos fácilmente a través de las raíces de la planta. La cantidad de fósforo en el suelo se expresa como P_2O_5 y este se clasifica en fósforo inorgánico y fósforo orgánico.

Las diferentes fuentes de fósforo que existen en el suelo pueden ser categorizadas como fósforo inorgánico y orgánico. La distribución de las diferentes formas de fósforo en el suelo depende de factores que incluyen tipo de suelo, pH, tipo de vegetación, actividad microbiana y entradas de fertilizantes (24).

3.6. Presentación del fósforo en el suelo

Dentro de los requerimientos esenciales para el crecimiento y funcionamiento de la planta, se encuentra el fósforo involucrado en el desarrollo de la raíz y del grano, en el

crecimiento y la floración, además se encuentra constituyendo los fosfolípidos de las membranas celulares y del material genético; cumple funciones en el metabolismo energético celular y en procesos de fotosíntesis, glucólisis, respiración y síntesis de ácidos grasos (22).

En el suelo existen diferentes fuentes de fósforo que pueden ser categorizadas como fósforo inorgánico y orgánico. La distribución de las diferentes formas de fósforo en el suelo depende de factores que incluyen tipo de suelo, pH, tipo de vegetación, actividad microbiana y entradas de fertilizantes. (22)

El P lo podemos encontrar de cuatro formas en el suelo en la solución del suelo (asimilable), fijado como arcillo húmico (cambiable o lábil), formando parte de la materia orgánica (precipitado en P cálcico y adsorbido en geles de hierro y aluminio) y finalmente formando la roca madre (no asimilable). (24)

El fósforo inorgánico se encuentra formando parte de minerales de calcio, hierro y aluminio originados por mecanismos de precipitación y pueden liberar fósforo muy lentamente por medio de la meteorización. Los compuestos de fósforo inorgánico pueden encontrarse en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo (Tabla 1); también pueden formar enlaces de gran estabilidad con hidróxidos de hierro, aluminio o manganeso y son menos solubles que los compuestos de fósforo orgánico. El P disponible para las plantas se encuentra en el suelo en forma de ortofosfatos, que son formas inorgánicas solubles, encontrándose iones monobásicos ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) y dibásicos (HPO_4^{-2}) (22). Los minerales primarios como las apatitas, hidroxiapatitas y oxiapatitas principales representantes del P inorgánico, este no es asimilable por las plantas ya que es insoluble y difícilmente solubilizable, por ello realiza procesos de intercambio a una velocidad muy lenta. (23)

Tabla 1. Formas de fósforo inorgánico en el suelo, Beltrán, 2014. (22)

Tipo de fosfato	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	Muy abundante
	Oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$	Menos abundante
	Fluoroapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaFe}_2$	Muy abundante
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$	Menos abundante
	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Menor solubilidad
	Fosfato dicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	Mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	Livianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
Fosfato de aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles

Por otra parte, el fósforo orgánico presente en diversos suelos puede representar cerca de 50% del fósforo total insoluble; suele hallarse en la materia orgánica, que se origina por la degradación microbiana de restos de animales y vegetales, sus principales formas son el fosfato de inositol, los ácidos nucleicos y fosfolípidos, este es degradado por los microorganismos presentes en el suelo (22).

3.7. Ciclo de Fósforo

El ciclo está determinado por el depósito principal de P constituido por rocas fosfóricas. El ciclo comienza con los iones de fosfatos disueltos, las plantas lo absorben a través de sus raíces y lo distribuyen en todas las células. A su vez, los animales lo adquieren al ingerir los vegetales. Al morir las plantas y los animales a través de sus excretas liberan fósforo insoluble y las bacterias que solubilizan fosfato transforman el fósforo en fosfatos inorgánicos

disueltos, una parte de dichos fosfatos son arrastrados al mar, los cuales descienden hasta el fondo y forman rocas, la otra parte de estos fosfatos lo toman las algas, las aves marinas y los peces siendo finalmente ingeridos por los seres humanos con lo cual se completa el ciclo (Figura 2) (23).

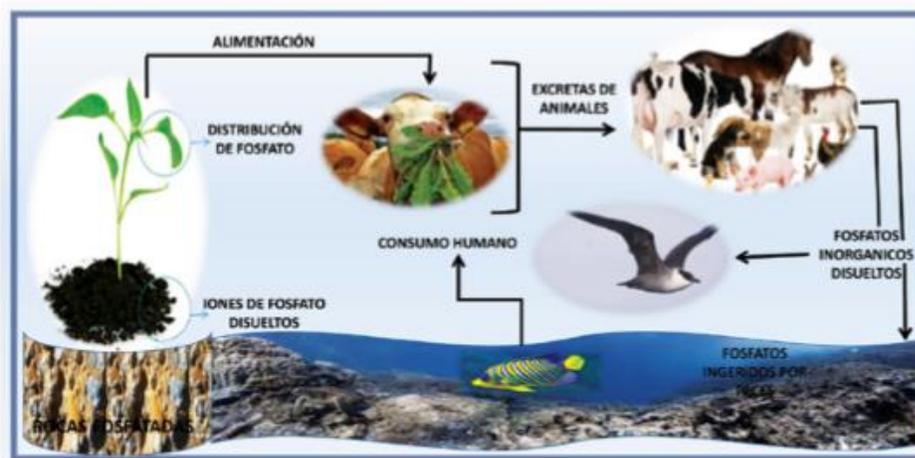


Figura 1. Ciclo del fósforo. Corrales *et al*, 2014 (23)

3.8. Solubilización de fósforo una nueva alternativa biológica

La solubilización de fosfatos es una de las funciones que se ha convertido en tema de investigación. Entre los géneros bacterianos que poseen esta cualidad se destacan *Bacillus sp*, *Stenotrophomonas sp*, *Burkholderia sp*, *Pseudomonas sp*, *Rhizobium sp*, *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter aerogenes* y *Streptomyces sp*, entre otros. La presencia de estas bacterias en el suelo aumenta la cantidad de diferentes iones, uno de éstos es el fósforo que al ser hidrolizado con enzimas como las fitasas, facilitan la movilidad de este elemento en el suelo y lo transforman en un compuesto accesible para la planta (22).

Estos microorganismos, están especialmente asociados con las raíces, tienen la habilidad de incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad; reconocidos como PGPR (22).

Estos transforman los fosfatos insolubles a formas solubles por la acción de mecanismos directos o indirectos. Entre ellos se destacan: i) la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos, ii) quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y iii) asimilación directa de fosfatos insolubles por microorganismos que lo acumulan en sus células y los liberan posteriormente. En la Tabla 2 se presenta un resumen de los principales procesos involucrados en la solubilización de fosfatos (25).

Tabla 2. Principales procesos microbianos involucrados en la solubilización de fosfatos. Restrepo et al, 2015 (25)

Tipo de proceso	Principal causa de disolución mineral	Principal reacción que lleva a la disolución mineral	Aplicabilidad a fosfatos minerales
Acidificación del medio	Liberación de protones (H ⁺) o producción de ácidos inorgánicos fácilmente disociables	Disminución del pH del medio, formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad	Fosfatos de Ca ²⁺
Formación de complejos metálicos	Liberación de ácidos orgánicos o complejos (quelantes)	Formación de complejos metálicos (incluyendo quelatos en el caso de ácidos di- tricarboxílicos o hidrocarboxílicos)	Fosfatos de Ca, Al ³⁺ y Fe ³⁺
Reducción de metales	Actividad redox de bacterias o sus exudados (metabolitos secundarios)	Reducción de metales con estados de oxidación variable (ligados a fosfatos) a un bajo estado de oxidación (resultando en un fosfato más soluble)	Fe ³⁺ fosfato
Disolución de fosfatos mediada por enzimas	Liberación extracelular de enzimas específicas (Fosfatasas)	Hidrólisis enzimática de ésteres de fosfato orgánicos pobremente solubles liberando fosfatos inorgánicos	Varios ésteres de fosfatos orgánicos (fitatos, fosfolípidos)
Disolución indirecta de fosfatos	Estimulación microbiana de exudación de ácidos orgánicos a la planta	El mismo mecanismo para el tipo 2 (formación de complejos metálicos) pero liberados por la interacción planta-microorganismo	Fosfatos de Ca ²⁺ , Al ³⁺ y Fe ³⁺

La solubilización del fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del suelo. Existen dos mecanismos para que esto ocurra. El primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H⁺ provenientes del citrato se intercambian por el P ligado a la superficie de los cristales de Al (OH)₃ o Fe (OH)₃ reduciéndolos y liberando al P. El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por las BSP (bacterias solubilizadoras de fósforo), el cual involucra la formación de complejos con iones de metales provenientes de la roca fosfórica (Restrepo et al, 2015). El gran número de rizobacterias Gram negativas aisladas

que solubilizan fosfato usan la glucosa como fuente de carbono (Goldstein et al., 2003). Al usar este criterio, entonces las bacterias que posean la ruta de la oxidación directa de la glucosa tienen la habilidad de disolver los fosfatos.

Los ácidos orgánicos que solubilizan fosfato son de bajo peso molecular y poseen uno o más grupos carboxilo. Dependiendo de las propiedades de disociación y el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos tienen carga negativa, por lo que pueden formar complejos con cationes metálicos en solución y el desplazamiento de aniones de la solución del suelo, provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular, como carbohidratos, péptidos y lípidos (26).

Éstos juegan un papel determinante en el ciclo biológico de nutrientes, en la agricultura y los ecosistemas forestales. Los ácidos orgánicos o carboxílicos son sustancias polares y son capaces de formar puentes de hidrógeno entre sí y con el agua. La mayoría de los ácidos orgánicos producidos por las BSP (Bacilos solubilizadores de P) son alifáticos, es decir, son ácidos no aromáticos (Figura 3).

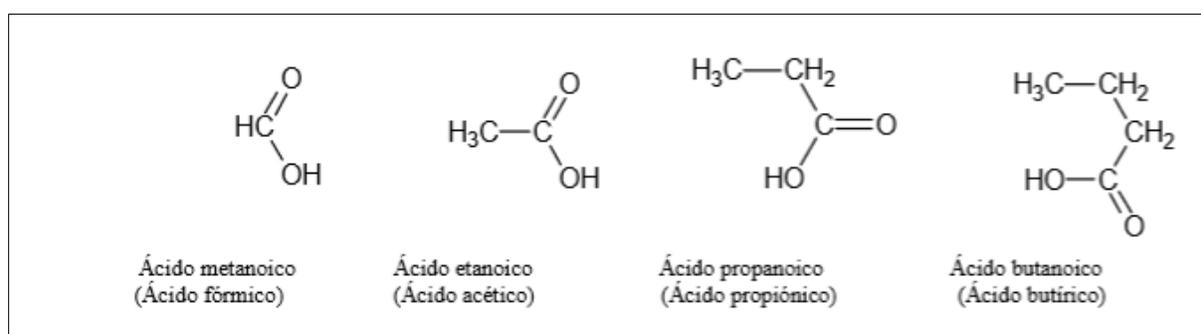


Figura 2. Ácidos orgánicos alifáticos producidos por bacterias solubilizadoras de fosfato. Restrepo et al, 2015 (25)

La producción de ácidos orgánicos por las BSP tiene acción directa en la acidificación, quelación, precipitación y las reacciones de óxido- reducción en la rizósfera; ácidos como el

oxálico, cítrico, láctico, tartárico y 2-cetoglucónico tienen propiedades quelantes y solubilizadoras sobre los metales. La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales puede atribuirse a que disminuyen el pH y, más aún, a la formación de complejos estables con Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} . Reacciones similares ocurren al prevenir la fijación de fosfatos añadidos al suelo como fertilizantes. Se ha demostrado que los ácidos orgánicos reducen la precipitación de fosfato por el hierro y el aluminio; el ácido que produce la mayoría de bacterias es el ácido láctico. Los hidroxiaácidos se consideran mejores para disolver la apatita que los ácidos volátiles, debido a que forman quelatos con el calcio. Es decir, que las rutas biosintéticas en las bacterias solubilizadoras de fosfatos se determinará por la producción de ácido que estas generen (Tabla 3)

Tabla 3. Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP). Restrepo et al, 2015 (25)

Ácido	Fórmula	Ruta biosintética	Bacteria que lo produce	Referencia
Acético	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética)	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singh y Amberger (1998a)
Láctico	$\text{CH}_3\text{CHOH}_2\text{CO}_2\text{H}$	(Glicólisis) Fermentación láctica primaria	<i>Bacillus liqueniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bano y Musarrat (2003)
Oxálico	$\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singh y Amberger (1998a)
Cítrico	$\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{COHCO}_2\text{HCHO}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Erwinia herbicola</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i>	Goldstein (1995); Vassileva et al. (2000)
Butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	Oxidación anaerobia del piruvato	<i>Bacillus liqueniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Wan y Wong (2004)
Succínico	$\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ciclo del glioxilato y ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Liu et al. (1992)
Málico	$\text{HO}_2\text{CCHOHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Bacillus megaterium</i>	Singh y Amberger (1998b)
Glucónico	$\text{HO}_2\text{C}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$	Oxidación directa de la glucosa	<i>Erwinia herbicola</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>	Goldstein y Liu (1987)
Fumárico	$\text{HO}_2\text{CCOCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Harrison et al. (1972)
2-Cetoglucónico	$\text{HO}_2\text{CO}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$	Oxidación directa de la glucosa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> y <i>Bacillus firmus</i>	Anderson et al. (1985)

La solubilización de fósforo mineral es un proceso relacionado fundamentalmente con la producción y liberación de enzimas entre ellas tenemos: fosfatasas, que participan en la desfosforilación de los grupos fosfoester unidos a la materia orgánica; fitasas, que catalizan el proceso de hidrólisis del ácido fítico liberando de forma secuencial hasta seis grupos ortofosfatos libres y; las fosfonatasas y C-P liasas, enzimas que participan en la ruptura del enlace carbono-fósforo de los organofosfonatos. El principal trabajo le corresponde a las fosfatasas ácidas y a las fitasas, debido a la presencia predominante de sus sustratos en el suelo (27).

3.9 Enzimas Fosfatasas

Las fosfatasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfomonoesteres que se encuentran en los sistemas biológicos. De acuerdo con su localización celular, tienen como función eliminar un fosfoester orgánico que forma parte de componentes de alto peso molecular, ejemplo RNA o DNA, suministrando a la célula, nutrientes esenciales para su desarrollo (27). Estas enzimas han sido clasificadas en cinco subclases diferentes: fosfatasas alcalinas, fosfatasas ácidas, fosfatasas histidinas ácidas y proteínas fosfatasas. Diferentes patrones de actividad fosfatasa están ampliamente distribuidos en las bacterias, particularmente las que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. La producción de estas enzimas está controlada por mecanismos regulatorios complejos, de manera que la actividad de las mismas es detectable sólo bajo condiciones ambientales específicas (27).

3.10 Enzimas Fitasas

Durante más de 20 años las enzimas fitasas (inositol hexofosfato hidrolasas) han atraído

la atención de los científicos por ser consideradas proteínas con gran aplicación comercial y ambiental. Estas enzimas pertenecen a una clase especial de fosfatasas capaces de hidrolizar el ácido fítico (inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakisfosfato), a derivados del myo-inositol menos fosforilados y a fosfato inorgánico. Las fitasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; están presentes en plantas, microorganismos, así como en algunos tejidos animales (28). Se ha reportado la producción de esta enzima en bacterias gram positivas, como es el caso de las bacterias del género *Bacillus* y bacterias Gram negativas, *Escherichia. coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas sp.*

En su mayoría, las fitasas producidas por bacterias gram negativas son proteínas intracelulares y periplasmáticas, a diferencia de los microorganismos gram positivos donde estas enzimas son extracelulares. Hasta ahora dos tipos principales de fitasas han sido identificadas, fitasas ácidas, con un pH óptimo entre 2.5 y 5.5, que pertenecen a la familia de las fosfatasas histidinas ácidas (HAP) porque presentan una secuencia altamente conservada, RHGXRXR hacia el N terminal y no necesitan ningún cofactor para su actividad óptima, y las fitasas alcalinas con un pH óptimo entre 6.0 y 8.0, consideradas como fitasas de nuevo tipo, por su alta especificidad al ácido fítico y la presencia necesaria del ion calcio para su actividad enzimática (29).

3.11 Banco de cepas

Es importante entender que para el mantenimiento de un banco como este, los cultivos deben permanecer puros y homogéneos bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética. Hay gran número de métodos descritos para la preservación microbiana. Los criterios a ser considerados para la selección del método son la viabilidad, pureza, costos del proceso, cantidad de cultivo (para la producción de

microorganismos) y frecuencia de uso (30).

La función básica de la conservación es mantener la viabilidad, no contaminación y estabilidad de las características de la cepa conservada y que sea lo más posiblemente parecida a la original. No todas las cepas responden de igual forma al mismo método, incluso algunas especies son variables en el mismo proceso. Es importante enfatizar que el éxito o el fracaso de cualquier método, depende de la utilización de un medio adecuado, procedimiento utilizado en la cultivación y edad del cultivo, esto es particularmente importante cuando trabajamos con bacterias que contienen plásmidos de resistencia o DNA recombinante, ó que exhiben fases de crecimiento como los esporoformadores (31).

3.12 Screening microbiano

Existen diferentes estudios que reconocen la capacidad de algunos microorganismos de solubilizar el fósforo, por esto es necesario realizar un cribado de los microorganismos existentes en las muestras de interés. La selección de cepas se realiza por medio de crecimiento en medios de cultivos selectivos, uno de los primeros aislamientos reportados fue por Pikoskaia en 1948, quien descubrió en estudios de cultivos *in vitro* bacterias ácido lácticas con capacidad solubilizadora y estandarizó el medio de cultivo que lleva su nombre (22,29).

Posteriormente en 1982 Banik y Dey evaluaron la disponibilidad de fosfato en suelos aluviales después de la inoculación de algunos microorganismos solubilizadores de fosfato y encontraron 2 cepas de hongos con capacidad solubilizadora *Aspergillus candidus* y *A. fumigatus*, utilizando medios de cultivo con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo.

Todas las investigaciones realizadas a nivel mundial se han destacado por la utilización

de medios de cultivo como PSM (phosphate solubilizing microorganisms) desarrollado por Habte M, Osorio (2001) (32) y SMRS-1 (sundara modified rao sinha) usado y estandarizado por Sundara, R. y W. Sinha (1963) (33), que utilizan el fosfato tricálcico como única fuente de fósforo y glucosa como fuente de carbono.

Chuang et al para el 2007 demostraron en uno de sus estudios, que la fuente de P insoluble utilizada en el medio de cultivo, determina el tipo de ácidos orgánicos producido por el microorganismo responsable de la solubilización (34)

3.13 Viabilidad y pureza

Para la evaluación de cepas microbianas es importante tener en cuenta la viabilidad y pureza para garantizar los resultados que se puedan obtener mediante los ensayos, también es importante que los cultivos permanezcan puros y homogéneos bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética (35).

La recuperación de los microorganismos según el esquema propuesto por Espitia (36) y Díaz (37). Para la identificación de viabilidad se realizan a partir de repiques de colonias aisladas en medios selectivos para solubilizadores de fósforo y se verifica pureza por medio de la tinción de gram. Estos se conservan en refrigeración y se pueden liofilizar con glicerol a -70°C para posteriores análisis.

3.14 Evaluación y técnicas de promotores del crecimiento vegetal (PGPR)

En la actualidad y gracias a los cambios que se han hecho evidentes en los suelos se ha buscado implementar los microorganismos benéficos del mismo con capacidad promotora de crecimiento vegetal y que además sean controladores de patógenos en las plantas estos son

llamados PGPR (plant growth promoting rhizobacteria; rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) las cuales se pueden encontrar en asociaciones simbióticas o de vida libre, estos últimos asociados a las partículas del suelo generando interacciones con las raíces de las plantas, en la zona de la rizósfera (28).

A finales de la década de las 70, Kloepper y colaboradores fueron los pioneros en introducir el término PGPR para referirse a las rizobacterias capaces de provocar un efecto benéfico en las plantas. Recientemente, la denominación se ha extendido a microorganismos PGP para incluir hongos y cualquier organismo afín (P. criollo et al, 2012).

Dentro de los mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal encontramos dos tipos, mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta. Dentro de estos encontramos la producción de promotores de crecimiento vegetal (también llamados fitohormonas), como auxina, giberelinas y citoquininas y los mecanismos indirectos son aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes patógenos que interfieren con el desarrollo de la planta (38)

Adicionalmente, se ha demostrado que las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante solubilización de fósforo, fijación de nitrógenos y producción de sideróforos. (39).

3.15. Actividad Solubilizadora de Fósforo

El fósforo es un elemento indispensable para el desarrollo y crecimiento vegetal, este se encuentra en grandes cantidades en el suelo, pero no en la forma química usada por las plantas (ortofosfatos: H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) (40), lo que conlleva a una deficiencia de este elemento en las

plantas. En el laboratorio se han trabajado diferentes métodos para evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de microorganismos presentes en el suelo, uno de estos métodos es por medio de aislamientos en medios selectivos que utilizan como única fuente de fósforo la roca fosfórica o fosfato tricálcico; estos medios tienen además glucosa como fuente de carbono haciendo que los microorganismos utilicen mecanismos de solubilización para su crecimiento y desarrollo.

Uno de los medios usados fue el desarrollado por Osorio y Habte, 2001 donde a partir de medio sólido se aislaron microorganismos solubilizadores de fosfato usando el fosfato tricálcico como única fuente de fósforo el cual es llamado PSM y SMRS-1 y como indicador de pH el púrpura de bromocresol, se consideraron al final de la incubación aquellas colonias que se desarrollaron rápida y abundantemente y que presentaron un halo de color amarillo a su alrededor evidenciando así la capacidad de solubilización. (41)

En el trabajo de Usha Seshachala *et al*, realizado en la India, también se evidencia el uso del medio Pikovskaya el cual usa el fosfato tricálcico como fuente de fósforo, en este estudio se aislaron microorganismos (bacterias y hongos) de la rizósfera de un cultivo de pimienta; una especia muy apetecida en todo el mundo. (42)

Dentro de los ensayos de solubilización cabe destacar el método cualitativo de la actividad solubilizadora de fosfato, el cual consiste en la siembra en el medio de cultivo NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate growth médium) de las cepas a evaluar utilizando la técnica de difusión en pozos en el agar y evidenciando los halos de solubilización; a partir de los diámetros de los halos de solubilización y los diámetros de las colonias bacterianas se puede determinar la eficiencia de solubilización de cada una de las cepas según Seshadri. (43).

3.16. Técnicas de Bioensayo en vivero

El Ministerio de Agricultura define los viveros forestales como sitios destinados a la producción de plántulas para diferentes fines, en donde se les proporciona todos los cuidados requeridos para ser trasladadas al terreno definitivo de plantación, siendo aquellos que constituyen el primer paso en cualquier programa de repoblación forestal. (44)

Las necesidades de los viveros en programas de reforestación se deben básicamente a que en el vivero la inversión económica es mínima en lo referente a preparación del sitio, fertilización y mantenimiento; además el viverista puede tener un mejor control durante el tiempo de la producción de plantas antes de ser llevadas al campo; entre uno de los tipos de viveros se encuentran los usados en investigación los cuales son temporales y mantienen las plántulas hasta un límite de tiempo con las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y cuidados durante y en pro de su desarrollo, la producción de estos viveros se utilizan únicamente para fines de investigación.

Los bioensayos realizados en viveros consisten en la realización de un inóculo bacteriano a partir de cepas aisladas y purificadas previamente, posteriormente son inoculadas a las especies de plántulas, estas plantas son sometidas a mediciones en periodos de tiempo establecidos con criterios y variables específicas previamente para el desarrollo del objetivo del ensayo. (45).

3.17 Árboles forestales uso en ensayos de restauración

3.17.1 Descripción vegetal

El uso de árboles reforestadores en Bosque Alto Andino con fines en restauración ecológica se representa por una de las clases más empleadas llamada *Magnoliopsida* esta incluye

a todas las plantas con flores. Son plantas vasculares generalmente con raíces, tallos y hojas, el cilindro central del tallo con haces vasculares dispersos (atactostela) con traza foliar (eustela). Xilema formada por vasos al menos en raíces, floema con tubos cribosos y células acompañantes (46).

Caracterizadas por sus estructuras sexuales agregadas y asociadas con hojas especializadas para formar flores. Típicamente, la flor consta de un verticilo externo de miembros del perianto, los sépalos (cuyo conjunto forma el cáliz) y el verticilo interno, los pétalos (conformando la corona) (46).

Los ciclos reproductivos están representados por el androceo y el gineceo, constituidos por estambres y carpelos respectivamente. Cada estambre (microsporofilo) consiste en un filamento y una antera, la cual contiene 4 sacos polínicos (microsporangios), el gametofito masculino está representado por el grano de polen (2 o 3-nucleado). Los carpelos (megasporofilos), unidos o separados, se diferencian en ovario, estilo y estigma; el ovario encierra uno o más óvulos (rudimentos seminales), cada uno de los cuales contiene un gametofito femenino consistente en un saco embrionario sin arquegonio, típicamente 8- nucleado. El ovario (a veces asociado con otras estructuras) madura para formar un fruto dehiscente o indehiscente conteniendo una o más semillas (46).

3.17.2 *Vallea stipularis*

REINO *Plantae*

PHYLUM *Magnoliophyta*

CLASE *Magnoliopsida*

ORDEN *Malvales*

FAMILIA *Elaeocarpaceae*

GÉNERO *Vallea*

ESPECIE *Vallea stipularis*

Pertenecen al grupo funcional de árboles nativos zoócoros, comúnmente conocido como Campano, chaque, gaque, raque, es un árbol o arbusto de hasta 10 m de alto, con el tallo muy ramificado. Hojas simples, alternas, cordadas y con un par de estípulas reniformes en la base del pecíolo. Flores grandes, vistosas y de color rosado, dispuestas en racimos terminales o axilares. Fruto en cápsula, globosa, carnosa, de color verde-amarillento y al madurar se torna de color café. (47,48)

Fenología: Floración desde abril hasta junio.

Propagación: por semilla (49)

Distribución y hábitat: se encuentra en las tres cordilleras y en la Sierra Nevada de Santa Marta, entre 2600 y 3600 m de altitud. Especie propia de bosques altoandinos, crece en bosques secundarios, bordes de carretera y quebradas y en zonas alteradas de potrero, plantaciones forestales de *Pinus patula* y matorrales de *Ulex europeus*. (48)

Clima: Crece en regiones templadas y frías. Es vulnerable a heladas y sequías prolongadas. Agua: Especie que prefiere zonas subhúmedas a húmedas. (49)

Suelos: Franco, Franco arcillosos y Franco limosos. Crece en suelos bien drenados

Usos e importancia: su madera es usada en ebanistería o para postes en cercados o aprovechada como leña. Por sus atractivas flores es una especie ornamental y melífera.

Rasgos de HV importantes para la restauración: La polinización es zoófila,

principalmente por abejorros y abejas. El fruto es una cápsula dehiscente de dispersión barócora o zoócora ya que posee un arilo amarillo atrayente para las aves. Tolera un rango amplio de incidencia de luz puesto que crece bajo luz directa o sombra. (48)

3.17.3 *Escallonia paniculata*

REINO *Plantae*

PHYLUM *Magnoliophyta*

CLASE *Magnoliopsida*

ORDEN *Escalloniales*

FAMILIA *Escalloniaceae*

GÉNERO *Escallonia*

ESPECIE *Escallonia paniculata*

Conocida comúnmente como Tobo o Tibar, es un árbol que alcanza los 9 m de altura y un diámetro de tronco de 40 cm, la corteza es acanalada, hojas oblanceoladas, alternas de 8.5 por 2.5 cm con su parte inferior verde blancuzco. Maduran con color amarillo. (18)

Flores de 6 mm, de diámetro. Al caer los pétalos queda el fruto en forma de cápsula de 8 por 3 mm, con semillas diminutas. Fructifica en los meses de enero y febrero. (18)

Fenología: Desde septiembre hasta diciembre (51)

Distribución y hábitat: Los tíbares son típicos habitantes de los bosques andinos húmedos. Normalmente se los observa creciendo en baja densidad, mezclados con otras especies como encenillos, cedros, raques, coronos, chuques y otros árboles. En algunas partes, los tíbares pueden ser mucho más comunes y llegar a ser dominantes en los relictos de bosques de montaña. Cerca de Bogotá, uno de los lugares con más tíbares son los alrededores de La Pradera

(Subchoque). Distribuidos en las montañas de Costa Rica y Panamá y Andes desde Venezuela hasta Bolivia. En Colombia la Sierra Nevada de Santa Marta y las tres cordilleras, entre 1700 y 3300 m. (52)

Clima: Crece en regiones templadas y frías. No tolera vientos secos. (52)

Usos: Se usa comúnmente como planta de protección, especialmente en las áreas costeras (52). Es una especie ornamental que puede ser plantada en parques y jardines, el árbol ayuda a la conservación de las cuencas hidrográficas (53)

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo de investigación y enfoque

Investigación analítica; experimental y prospectiva

4.1.1. Enfoque

El trabajo presenta un enfoque mixto de pruebas cualitativas, cuantitativas, junto con la revisión bibliográfica y el análisis de datos estadísticos.

4.2. Universo, población y muestra

4.2.1. Universo: Bosque alto Andino según el autor Holdridge (1978) clasificado como Bosque húmedo montano (bh-M) y Bosque muy húmedo montano (bmh-M).

4.2.2. Población: Bosque alto Andino Corredor Chingaza- Sumapaz sede de Usme de la Universidad Antonio Nariño (UAN) y Bosque Alto Andino ubicado en la localidad de Usme.

4.2.3. Muestra: Se tomaron 2 muestras de suelo sin repetición una del Bosque Alto Andino y la otra la sede de Usme de la Universidad Antonio Nariño (Corredor Chingaza-Sumapaz).

4.3. Hipótesis, variables, indicadores

4.3.1. Hipótesis de investigación

Los microorganismos solubilizadores de fosfato con potencial biotecnológico aislados del suelo de Bosque Alto Andino y suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz), pueden ser usados para restauración ecológica.

4.3.2. Variables

4.3.2.1. Dependientes:

Rizobacterias, capacidad solubilizadora de fósforo, crecimiento vegetal de las plantas nativas (altura, grosor de tallo, número de hojas), viabilidad y pureza en el banco de cepas.

4.3.2.2. Independientes:

Muestra de suelo, medios de cultivo, plantas nativas del Bosque Alto Andino, condiciones de vivero.

4.3.3. Indicadores:

Formación de halos solubilizadores, cambio de pH del medio, UFC, crecimiento vegetal de las plantas nativas (altura, grosor de tallo, número de hojas).

4.4 Técnicas y procedimientos

El presente estudio se realizó durante el periodo comprendido entre mayo de 2016 y diciembre de 2017 en dos fases, en la primera se realizó la evaluación microbiológica de rizobacterias solubilizadoras de fosfato en los laboratorios de microbiología y nanotecnología de la sede tecnoparque SENA Nodo Bogotá y la segunda fue el desarrollo del ensayo a escala de vivero realizado en las instalaciones de la Universidad Antonio Nariño sede Usme.

4.4.1 Muestreo del suelo

El proceso de muestreo # 1, se llevó a cabo en el suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) y el muestreo # 2 en el suelo del Bosque Alto Andino. Se obtuvo muestras representativas de los suelos a 15 cm de profundidad. Reconociendo valores de pH de 4,92 y disponibilidad de fosfato en forma PO_4^- de 36,30 mg/L del suelo con base en el estudio realizado por Crespo Antia J (18).

4.4.1.2 Ubicación del muestreo

La zona de estudio comprende el área del Corredor Chingaza-Sumapaz, el cual se localiza en el sur del Distrito Capital de Bogotá y hace parte de la zona rural de la localidad de Usme como Sede de la Universidad Antonio Nariño (UAN) (Figura 3), Con respecto al lugar del embalse, la zona se encuentra en una posición astronómica KR 3 - CL 129 Sur Bogotá con longitudes 4.483132, -74.121057 (Figura 4).



Figura 3. Ubicación área de estudio, Corredor Chingaza-Sumapaz, Sede Usme UA. Fuente: Msc. Carolina Jaime



Figura 4. Ubicación astronómica del Bosque Alto Andino, Sede Usme UAN. Google Inc. (2018). Google Earth (Versión 4.482833) [Software]. Disponible desde <https://www.google.com.co/maps/place/Colegio+Universidad+Antonio+Nari%C3%B1o+Usme/@4.482833>

4.4.2 Procesamiento de la muestra

4.4.2.1 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

Se realizó el aislamiento de 44 cepas de microorganismos solubilizadores de fosfato de 2 muestras provenientes del suelo de Bosque Alto Andino identificado como muestreo #1 y el suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz) que se identificó como muestreo #2; empleando los medios de cultivo PSM, SMRS- 1 y Pikovskaya los cuales contienen como única fuente de fósforo inorgánico el fosfato tricálcico o roca fosfórica e indicador púrpura de bromocresol (Chien y Hammond, 1978)(54). Todos los medios se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 121° C y 21 psi.

Para el análisis se pesó 10 g de la muestra de suelo en 90 ml de agua peptonada al 0,1 %, se realizaron diluciones seriadas en base 10 usando 9 ml agua peptonada estéril al 0,1% hasta la dilución 10^{-4} posteriormente se sembró por duplicado 0,1 ml de cada dilución en la superficie del medio, los medios empleados para el muestreo # 1 fueron PSM (phosphate solubilizing microorganisms) (32) y SMRS-1 (sundara modified rao sinha) (33) y para el muestreo # 2 PSM, SMRS-1 y Pikosvkaya. Se usó un inóculo biotecnológico (consorcio usado para nutrición vegetal) comprado en la Universidad Antonio Nariño como control positivo el cual contiene *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chroococcum* quienes presentan actividad solubilizadora (20) y como control negativo una caja con medio sin inocular; se incubó a 30 °C +/- 2 por 5 días.

Se eligieron todas las colonias que se desarrollaron rápida y abundantemente por sus características morfológicas macroscópicas de forma, color, tamaño, borde, superficie y elevación, que exhibieron mayores zonas de color amarillo (halos y/o acidificación del medio) a su alrededor y se realizó descripción microscópica por medio de tinción de Gram.

4.4.2.2 Screening de selección

La selección de las 44 colonias representativas se realizó a partir de la caracterización microscópica realizando tinción de Gram según Bergey's 1956 y macroscópica teniendo en cuenta criterios de tamaño, textura, forma, posteriormente se realizó prueba de Catalasa usando peróxido de hidrógeno al 30 % y Oxidasa utilizando discos de Citocromo C oxidasa. (50)

Se realizaron dos screening de selección, el primero teniendo en cuenta la caracterización fenotípica de las colonias con mayor capacidad solubilizadora evidenciada en la formación de halos alrededor de la colonia y/o acidificación del medio y capacidad de crecimiento en los medios de cultivo SMRS-1, PSM y Pikosvkaya con una selección de 18 cepas.

Para segundo screening se usaron la prueba cualitativa (Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfato en medio NBRIP) y cuantitativa (Método de AIA) que a partir de los resultados se hizo la elección final de las 5 cepas potenciales para realizar el inóculo.

4.4.2.3 Conservación de las cepas

Se realizó la selección de los microorganismos a conservar, observando las colonias con crecimiento significativo en medios selectivos, realizando coloración de Gram y pruebas catalasa y oxidasa a las mismas; se efectuó la conservación teniendo en cuenta el esquema propuesto por Espitia y Díaz donde se indica adicionar glicerol al 50% en un tubo eppendorf y suspender una asada de la colonia a conservar, posteriormente guardar en ultracongelador a -70°C. (36,37)

4.4.2.3 Evaluación de Viabilidad y Pureza

Para la identificación de viabilidad se realizaron repiques de las colonias obtenidas del

primer aislamiento en los medios selectivos PSM, SMRS-1 y Pikovskaya se incubaron a 30°C por 5 días se observó presencia de UFC y se verificó pureza por medio de la tinción de Gram, estas se conservaron en refrigeración a 4°C para posteriores análisis.

4.4.2.4 Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfato

La evaluación cualitativa de la actividad enzimática se realizó por medio de la visualización de halos de solubilización de fósforo utilizando la metodología propuesta por Beltrán, donde se sumerge un disco de papel filtro estéril de 0.5 cm de diámetro en la suspensión microbiana colocándolo sobre el medio selectivo NBRIP; incubando las bacterias a 25 °C por 48 h determinando la eficiencia de cada una de las cepas a partir de la medición del diámetro de los halos de solubilización y de crecimiento de las colonias determinando el índice de solubilización expresado en porcentaje usando la siguiente fórmula:

$$IS : \frac{\text{diámetro del halo}}{\text{diámetro de la colonia}} \times 100$$

Luego del primer screening de selección en base a la caracterización fenotípica tomando como concepto de selección aquellas que presentaron mejor solubilización en los medios de cultivo PSM, SMRS-1 y Pikosvkaya en el aislamiento y purificación, se evaluó en medio selectivo NBRIP 18 cepas seleccionadas de las 44 aisladas; se usó como control positivo una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 donada por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca la cual ha demostrado su capacidad solubilizadora y como control negativo agua estéril. (9)

4.4.2.5 Ensayo de AIA (Ácido Indol Acético)

La producción de AIA se determinó en las 18 cepas seleccionadas, siguiendo el método descrito por Gutiérrez y Pérez; se realizó un preinóculo de 5 mL en caldo Trypticase soya en tubos Falcon®, se incubaron a 30 °C en shaker a 150 rpm por 24 h, posteriormente se centrifugó a 7000 rpm 5 minutos a temperatura ambiente, se ajustó a la densidad óptica de 0,20 Abs a 600 nm con NaCl al 0.85% estéril, se incubó a 30 °C en agitación de 150 rpm durante 72 h con triptófano al 0,2. (19)

Las muestras se centrifugaron cada 24 h durante 10 min a 12000 rpm, posteriormente se tomó 700 ul del sobrenadante y se adicióno 700 ul de reactivo de Salkowski (50 ml de ácido perclórico al 35% y 1 ml de solución de FeCl₃ 0,05 M) las mezclas se dejaron reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min, se tomó como control positivo la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Se observó el cambio de color a rosa el cual indica la producción de AIA y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm, haciendo la cuantificación de la concentración aplicando curva de calibración.

4.4.2.6 Pruebas de identificación de PGPR

Para la identificación y caracterización de las cepas, se tomaron colonias puras a partir de medios selectivos (SMSR-1, PSM, Pikovskaya), utilizando el sistema analítico de paneles identificación rápida BBL Crystal ® y la base de datos del mismo, permitiendo la definición del género y especie de las cepas a trabajar.

4.4.2.7 Realización de preinóculos y curva de crecimiento

El procedimiento para la preparación de los preinóculos se realizó a partir de la activación las cepas en tubos de 10 ml con caldo tripticasa de soya por duplicado, se seleccionaron de cuatro a cinco colonias aisladas del mismo tipo morfológico del cultivo en placa purificado. Se tomó de la superficie de cada colonia con un asa de siembra y se transfirió a un Erlenmeyer de 200 mL con caldos específicos para las cepas (es importante tener en cuenta que no se le adicionó indicador de pH). Se incubó el caldo a una temperatura de 35°C en agitación constante a 120 rpm.

Se la medición de biomasa por densidad óptica en espectrofotómetro en diferentes periodos de tiempo 8 h, 24 h, 26 h, 28 h, 30 h, 32 h, 48 h, 52 h hasta las 72 h midiendo la absorbancia partiendo de una suspensión bacteriana de cada cepa de $DO_{540nm} = 0,20$, permitiendo obtener la curva de crecimiento de la cepa para la realización final del inóculo.

Posteriormente se realizó una siembra en placa y al cabo de 48 horas se observó crecimiento y características microbiológicas.

4.4.2.8 Fase II. Evaluación de tratamientos inoculados a escala de vivero

Para la evaluación de los tratamientos se midieron las siguientes variables: largo del tallo (altura) desde la base de la planta hasta la hoja apical (cm), número de hojas (unidades) y diámetro del tallo (cm) tomado a 9 cm de la base de la planta. Se realizó un análisis estadístico de varianza simple ANOVA para determinar si existieron diferencias significativas de crecimiento entre los tratamientos y el control.

4.4.2.9. Bioensayo a escala de vivero

Se eligieron dos especies de plantas nativas Tibar (*Escallonia paniculata*) y Raque (*Vallea stipularis*) del Bosque Alto Andino seleccionadas en base a los resultados obtenidos en ensayos de campo en el proyecto de Restauración ecológica Chingaza–Sumapaz que evaluó diferentes especies vegetales en Campo.

Se seleccionaron las plantas que desarrollaron una alta capacidad de adaptación y supervivencia en zonas de alta montaña y que son actualmente utilizadas en restauración ecológica como especies pioneras o sucesionales tempranas nativas ayudando a formar núcleos de regeneración. Las plántulas se cultivaron en el vivero de la sede Usme de la Universidad Antonio Nariño por 6 meses hasta tener un largo de tallo inicial aproximado de 15 cm.

Se tomaron 35 plántulas por cada especie con características similares y homogéneas de 6 meses de edad a partir de la germinación, 10 fueron el control que no recibió ningún tipo de inóculo, las 25 restantes correspondieron a los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5), cada uno de los cuales se inoculó con un solo tipo de rizobacteria obteniendo un total de 35 plántulas por especie vegetal (Ver Fig 5 y 6). Con el fin de evaluar el efecto de los inóculos microbianos sobre el crecimiento de la planta, se midieron variables (altura, número de hojas y grosor del tallo) durante 4 meses.

Se evaluó el inóculo, compuesto por las 5 rizobacterias determinadas como promotoras del crecimiento vegetal, preparado a una concentración de 0,2 DO luego se inoculó sobre la planta en una concentración de 50% v/v.

El inóculo microbiano se diluyó al 50% y se aplicó una sola vez al inicio del experimento, los muestreos se realizaron durante 4 meses haciendo mediciones de las plantas cada 15 días. Se

realizó un muestreo inicial como diagnóstico del (T0), (T15), (T30), (T45), (T60), (T75), (T90), (T105), para evaluar la eficacia de los inóculos simples sobre el crecimiento vegetal.

Con el fin de evaluar el establecimiento de las rizobacterias inoculadas en el suelo de las plantas de Usme a escala de vivero, se tomaron muestras de 100 g de suelo de cada uno de los tratamientos y del control por cada especie vegetal. El muestreo se realizó en diferentes periodos de tiempo cada 30 días así: T30, T60, T90.

4.4.2.10 Diseño del experimento en vivero

Especie vegetal#1 Tibar (*Escallonia paniculata*)

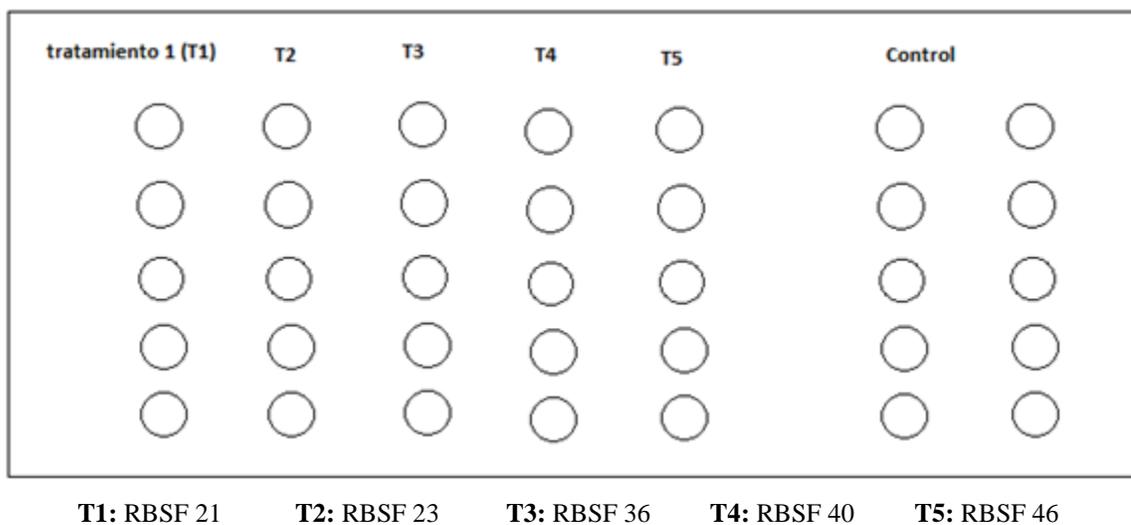


Figura 5. Visualización modelo de trabajo de tratamientos y controles de plantas según cantidad, Especie # 1 Tibar (*Escallonia paniculata*) Fuente: Msc. Carolina Jaime

Especie vegetal#2 Raque (*Vallea stipularis*)

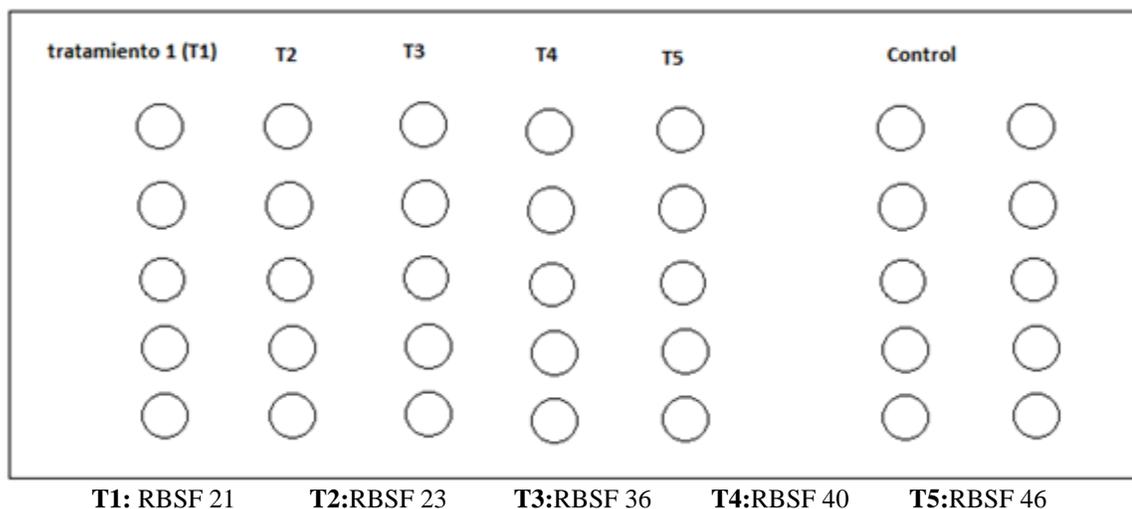


Figura 6. Visualización modelo de trabajo de tratamientos y controles de plantas según cantidad, Especie # 2. Raque (*Vallea stipularis*) Fuente: Msc. Carolina Jaime

4.4.2.11 Análisis de datos

Los datos obtenidos durante el desarrollo de la fase I del proyecto se analizaron mediante Estadística descriptiva representadas en tablas, gráficos de barras, gráficos circulares, entre otros mediante el software GraphPad Prism y Microsoft Excel.

Para la fase II se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) y varianza simple Mediante el software STATISTICA relase 7 statsoft 2007 de la Universidad Antonio Nariño sede Usme, el cual nos permitió determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos para cada una de las variables determinadas, en comparación de las cinco cepas con respecto al control frente a intervalos de tiempo estipulados para la medición.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio comprenden dos fases para el desarrollo de datos, la fase I indica resultados del muestreo total, desarrollo de pruebas para la clasificación, selección de las rizobacterias con capacidad PGPR y la fase II demuestra el rendimiento de las mismas a escala de vivero.

5.1 Fase I. Aislamiento y caracterización de rizobacterias solubilizadoras de fosfato

A partir de las muestras de suelo recolectadas y diferenciadas como muestreo # 1 (suelo Bosque Alto Andino) y muestreo # 2 (suelo de la Universidad Antonio Nariño sede Usme (Corredor Chingaza-Sumapaz), se obtuvo un total de 44 cepas (13 en el muestreo #1 y 31 del muestreo #2) más 3 cepas control, con características solubilizadoras de fosfato clasificadas según el medio de cultivo, dilución y tipo de muestreo representadas en la siguiente Tabla: (Ver tabla 4)

Tabla 4. Tablas número de cepas aisladas según medios y diluciones.

Muestreo #1		Muestreo #2			
PSM	SMRS-1	PSM		SMRS-1	Pikovskaya
6 CEPAS	7 CEPAS	10^{-3}	7 CEPAS	10^{-4} 11 CEPAS	10^{-3} 2 CEPAS
		10^{-4}	8 CEPAS		10^{-4} 3 CEPASc

Nomenclatura: PSM: Medio de cultivo (phosphate solubilizing microorganisms), SMRS-1, Medio de cultivo (sundara modified rao sinha), Pikovskaya: Medio de cultivo

La cuantificación de las cepas fue dada por el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que crecieron en cada medio de cultivo dependiendo de la dilución sembrada, para el

muestreo #1 se obtuvo un total de 13 UFC (Tabla 5), tomando desde la dilución 10^{-1} hasta 10^{-4} , las cuales se caracterizaron macroscópicamente (ANEXO 1), la dilución 10^{-4} presentó las colonias mejor aisladas y seleccionadas finalmente para este muestreo (Ver Tabla 6):

Tabla 5. Número de UFC según número de muestro.

Muestreo #1		
Medio	Dilución	UFC
PSM	10^{-4}	6
SMRS-1	10^{-4}	7

Nomenclatura: PSM: Medio de cultivo (phosphate solubilizing microorganisms), SMRS-1, Medio de cultivo (sundara modified rao sinha), UFC: Unidades formadoras de colonias

Tabla 6. Descripción de dilución aislada por medio 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

Los aislamientos para el muestreo #1 indicaron un mayor crecimiento de bacilos Gram

negativos frente a bacilos Gram positivos tanto en el medio PSM como el SMRS-1 aunque en este último medio se evidencio más variedad en la morfología aislada (Figuras 7 y 8):

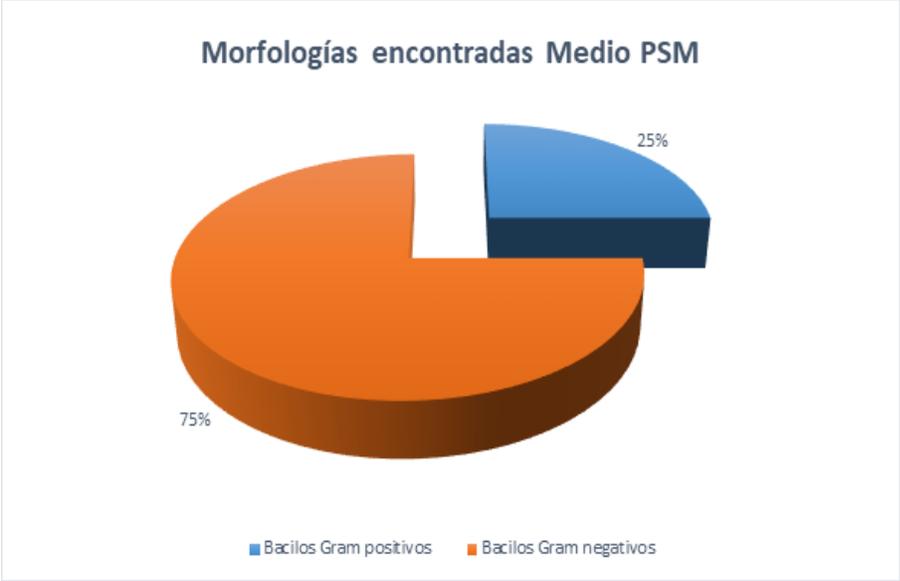


Figura 7. Caracterización morfológica en el medio PSM para el muestreo #1.

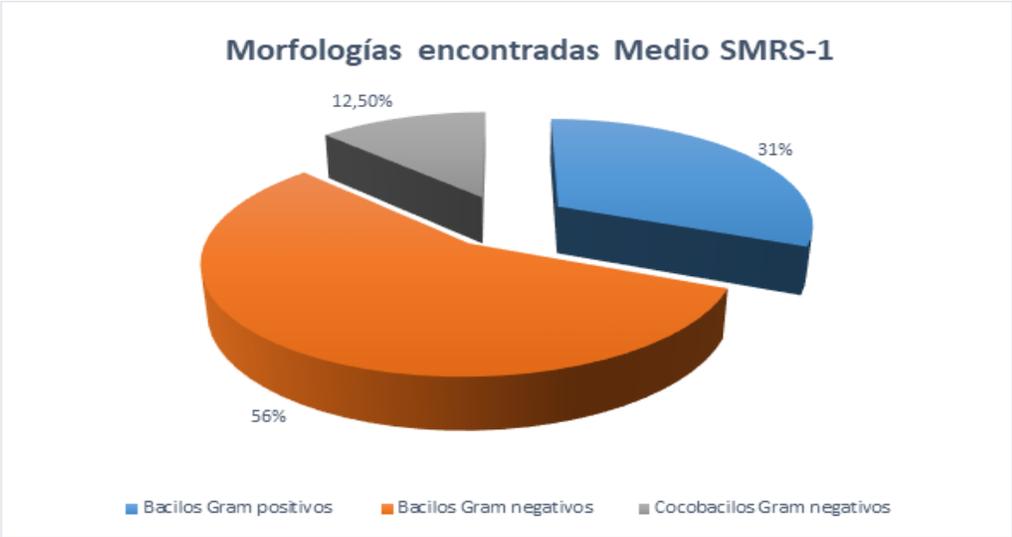


Figura 8. Caracterización morfológica en el medio SMRS-1 para el muestreo #1.

En el muestreo #2 se presentó el mismo patrón de aislamiento según la morfología

microscópica con su respectiva caracterización macroscópica (ANEXO 2) para cada cepa aislada de los medios de cultivo utilizados para el muestreo, es decir que se obtuvo un total de 31 UFC sembradas y aisladas (Tabla 7), para el medio PSM las diluciones sembradas fueron 10^{-3} y 10^{-4} , el grupo bacteriano más abundante fue de bacilos Gram negativos dentro de las 15 cepas trabajadas (Figura 9).

Tabla 7. Tabla UFC de la dilución aislada por medio muestreo #2.

Muestreo #2		
Medio	Dilución	UFC
PSM	10^{-3}	7
	10^{-4}	8
SMRS-1	10^{-4}	11
Pikovskaya	10^{-4}	5

Nomenclatura: PSM: Medio de cultivo (phosphate solubilizing microorganisms), SMRS-1, Medio de cultivo (sundara modified rao sinha), Pikovskaya: Medio de cultivo

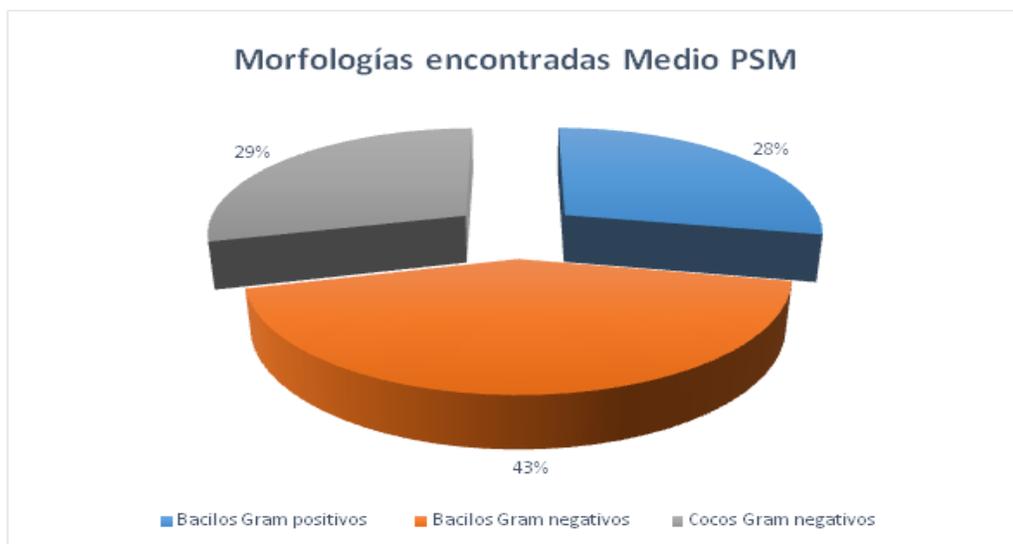


Figura 9. Caracterización morfológica en el medio PSM diluciones 10^{-3} y 10^{-4} para el muestreo #2.

Sin embargo, en el medio SMRS-1 se encontró menos variedad de grupos bacterianos desde la dilución 10^{-3} , presentando un recuento incontable de colonias con respecto a la dilución 10^{-4} , donde se aislaron las 11 colonias trabajadas posteriormente (Tabla 8), para esta dilución el predominio morfológico fue de bacilos Gram negativos en su mayoría cocobacilos (Figura 10).

Tabla 8. Tabla número de UFC medio SMRS-1 muestreo #2.

MEDIO SMRS-1	
Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
<p>Incontables</p> 	<p>11 UFC</p> 

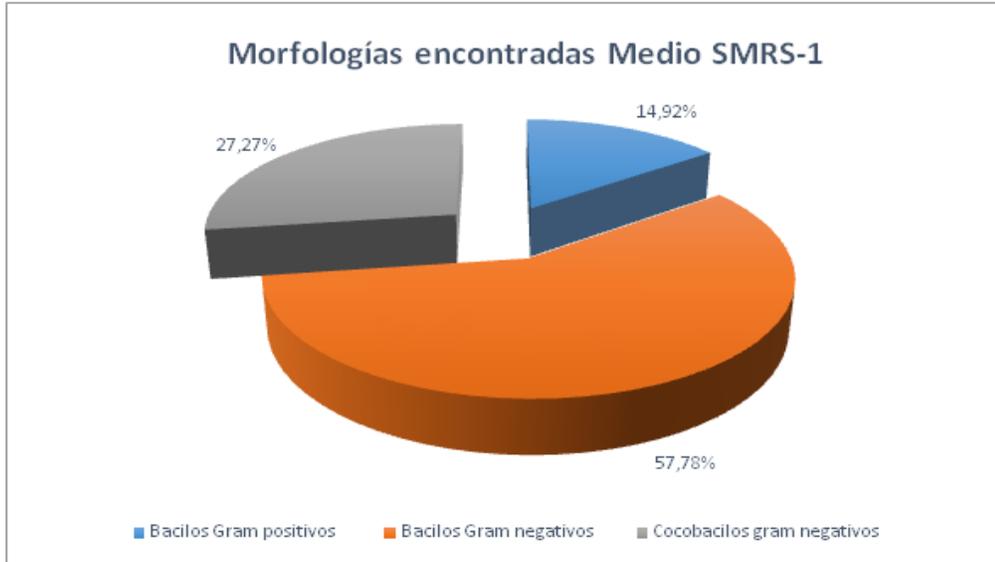


Figura 10. Caracterización morfológica en el medio SMRS-1 para el muestreo #2.

En el medio Pikovskaya el aislamiento fue de un 100% de bacilos Gram negativos caracterizados macroscópicamente (ANEXO 2) con un porcentaje considerable de cocobacilos (Figura 11).

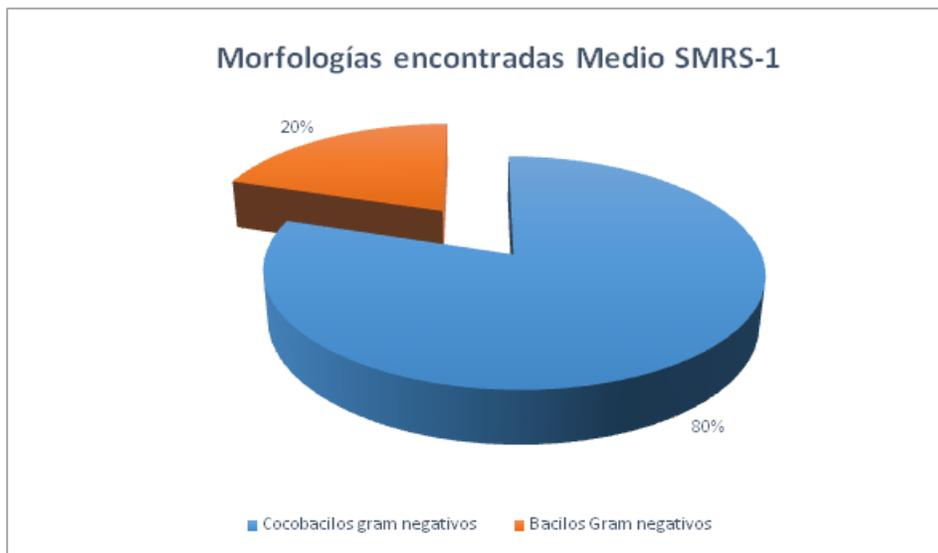


Figura 11. Caracterización morfológica en el medio Pikovskaya para el muestreo #2.

En la Tabla 9 se muestran los resultados de la codificación final utilizada como registro e

identificación de las cepas, en base al número de cepas aisladas por dilución, medio de cultivo y número de muestreo:

Tabla 9. Tablas número de cepas aisladas con su respectiva codificación para el banco de cepas del Nodo Tecnoparque.

CÓDIGO DE LA MUESTRA EN EL FORMATO	CÓDIGO	DILUCIÓN		CÓDIGO DE LA MUESTRA EN EL FORMATO	CÓDIGO	DILUCIÓN
RBSF01	PSM 1	PSM 1		RBSF23	0110403	PSM 10 ⁻⁴
RBSF02	PSM 2	PSM 2		RBSF24	0110404	PSM 10 ⁻⁴
RBSF03	PSM 3	PSM 3		RBSF25	0110405	PSM 10 ⁻⁴
RBSF04	PSM 4	PSM 4		RBSF26	0110406	PSM 10 ⁻⁴
RBSF05	PSM 5	PSM 5		RBSF27	0110407	PSM 10 ⁻⁴
RBSF06	PSM 6	PSM 6		RBSF28	0110408	PSM 10 ⁻⁴
RBSF07	SMRS1 1	SMRS-1 1		RBSF32	030201	pikovskaya
RBSF08	SMRS1 2	SMRS-1 2		RBSF33	030202	pikovskaya
RBSF09	SMRS1 3	SMRS-1 3		RBSF34	030203	pikovskaya
RBSF10	SMRS1 4	SMRS-1 4		RBSF35	030204	pikovskaya
RBSF11	SMRS1 5	SMRS-1 5		RBSF36	030205	pikovskaya
RBSF12	SMRS1 6	SMRS-1 6		RBSF37	0210401	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF13	SMRS1 7	SMRS-1 7		RBSF38	0210402	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF14	0110301	PSM 10 ⁻³		RBSF39	0210403	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF15	0110302	PSM 10 ⁻³		RBSF40	0210404	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF16	0110303	PSM 10 ⁻³		RBSF41	0210405	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF17	0110304	PSM 10 ⁻³		RBSF42	0210406	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF18	0110305	PSM 10 ⁻³		RBSF43	0210407	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF19	0110306	PSM 10 ⁻³		RBSF44	0210408	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF20	0110307	PSM 10 ⁻³		RBSF45	0210409	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF21	0110401	PSM 10 ⁻⁴		RBSF46	0210410	SMRS-1 10 ⁻⁴
RBSF22	0110402	PSM 10 ⁻⁴		RBSF47	0210411	SMRS-1 10 ⁻⁴

5.1.1 Codificación y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfato

Todos los datos de las 44 cepas aisladas fueron generalizados y organizados dentro de una ficha técnica (ANEXO 3), el registro final de la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica (O: citocromo oxidasa y C: catalasa) de las cepas permitió clasificarlas en los grupos bacterianos aislados, se presenta en el formato de identificación basado en el diseño según la ANLA (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales) representado en la Tabla 10. Esta caracterización fue el primer screening para la selección de 18 cepas potenciales debido a su alta solubilización de fosfatos.

Tabla 10. Codificación de 18 cepas seleccionadas en el primer screening, formato ANLA.

CÓDIGO DE LA MUESTRA	FECHA ELABORACIÓN DEL BANCO	CANTIDAD DE TUBOS EPPENDO RF O VIALES	MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN °C	NOMBRE DE LA PERSONA QUE REALIZÓ EL BANCO	# DE MUESTREO Y FECHA DE SIEMBRA	MEDIO DE CULTIVO DEL QUE SE AISLÓ	PRUEBA BIOQUÍMICA	
							C	O
RBSF03	29-JUN-2016	2	-70°C	Fernando G	#1	PSM	-	-
RBSF07	29-JUN-2016	2	-70°C	Fernando G	#1	SMRS1	-	-
RBSF09	29-JUN-2016	2	-70°C	Fernando G	#1	SMRS1	-	-
RBSF12	29-JUN-2016	2	-70°C	Fernando G	#1	SMRS1	-	-
RBSF13	29-JUN-2016	2	-70°C	Fernando G	#1	SMRS1	+	-
RBSF21	02-SEP-2016	2	-70°C	Diana Pérez	#2	PSM 10 ⁴	-	-
RBSF23	02-SEP-2016	2	-70°C	Diana Pérez	#2	PSM 10 ⁴	-	-
RBSF26	02-SEP-2016	2	-70°C	Diana Pérez	#2	PSM 10 ⁴	+	-
RBSF27	02-SEP-2016	2	-70°C	Diana Pérez	#2	PSM 10 ⁴	+	-
RBSF33	17-SEP-2016	2	-70°C	Jenssy Catama	#2	PIKOSVAYA	+	-
RBSF 36	21-NOV-2016	2	-70°C	Jenssy Catama	#2	PIKOSVAYA	+	-
RBSF 37	21-NOV-2016	2	-70°C	Jenssy Catama	#2	PIKOSVAYA	+	-
RBSF 38	21-NOV-2016	2	-70°C	Jenssy Catama	#2	SMRS-1	+	-

RBSF 40	21-NOV-2016	2	-70°C	Jessy Catama	#2	SMRS-1	-	-
RBSF 42	21-NOV-2016	2	-70°C	Jessy Catama	#2	SMRS-1	+	-
RBSF 43	21-NOV-2016	2	-70°C	Jessy Catama	#2	SMRS-1	-	-
RBSF 44	21-NOV-2016	2	-70°C	Jessy Catama	#2	SMRS-1	+	-
RBSF 46	21-NOV-2016	2	-70°C	Jessy Catama	#2	SMRS-1	-	-

5.1.2 Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfato

Como resultado del primer screening de selección se obtuvieron 18 cepas (Tabla 10) evaluadas cuantitativamente por su actividad solubilizadora de fosfato en el medio de cultivo NBRIP.

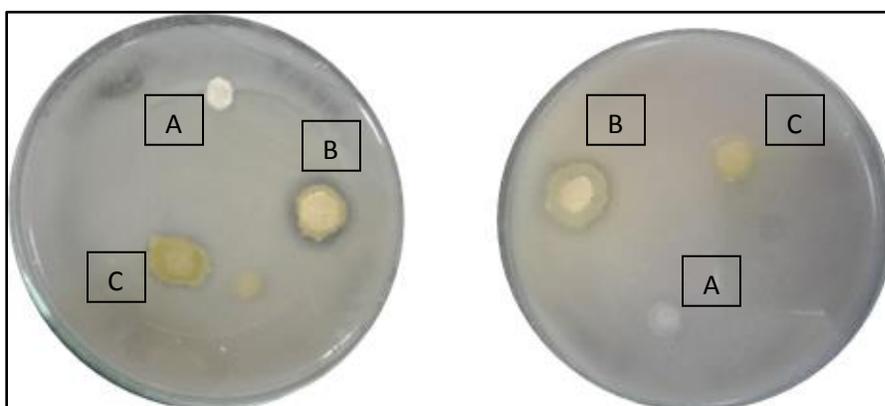


Figura 12. Resultados actividad solubilizadora de fosfatos. A. Control Negativo, B. Control Positivo, C. Cepa evaluada. Derecha: Cepa BSFN 36. Izquierda: Cepa BSFN 23.

En la Tabla 11 se observan los resultados de la medición en milímetros (mm) de los diámetros de las colonias, halo de solubilización e índice de solubilización de 5 de las 18 cepas seleccionadas como las más potenciales frente a las demás, comparando las cepas evaluadas frente a su respectivo control. (ANEXO 4)

Tabla 11. Tamaño de los halos de solubilización e índice de solubilización.

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%

El cálculo para el índice de solubilización se realizó mediante la ecuación: $IS: A/B \times 100$ donde, A: diámetro del halo, B: diámetro de la colonia, expresado en porcentaje; siendo uno de los criterios de selección final, eligiendo los índices de solubilización mayores a 5% durante el ensayo además de los resultados en los aislamientos previos.

En la Figura 13 se observan los porcentajes del índice de solubilización de las cepas evaluadas y del control. Se evidencia que las cepas RBSF 07, RBSF 21, RBSF 23, RBSF 33, RBSF 36, RBSF 40, RBSF 42 y RBSF 46 presentaron el mayor índice de solubilización frente al resto; en todos los ensayos, excepto en la cepa RBSF 46 el control fue mayor al presentado por la cepa evaluada; es decir que menos del 50 % de los 18 aislamientos fueron capaces de presentar *in vitro* dicha propiedad.

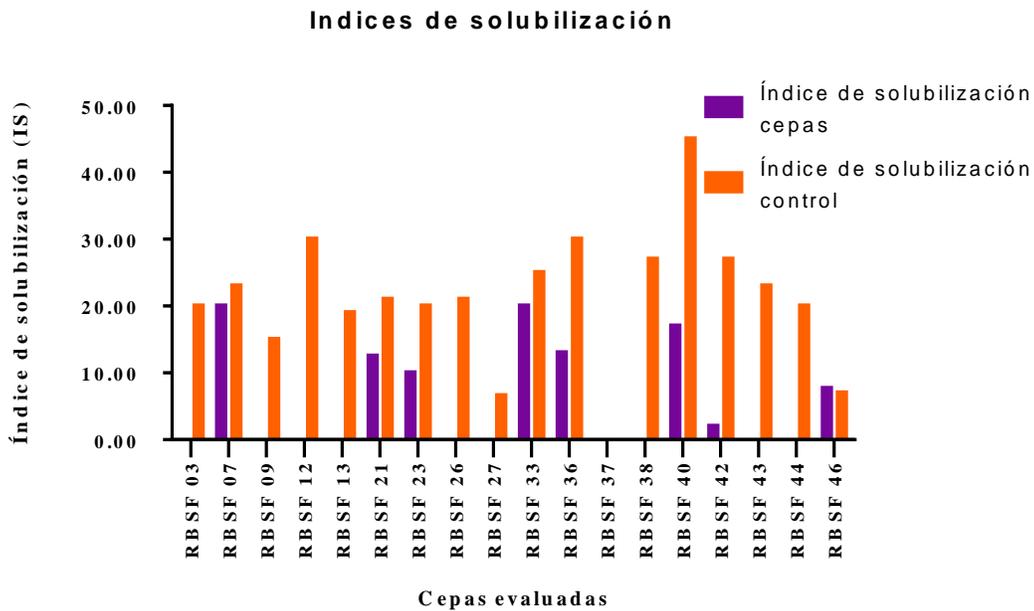


Figura 13. Índice de solubilización de las cepas trabajadas y controles en medio NBRIP

5.1.3 Ensayo de AIA (Ácido Indol Acético)

Con los valores obtenidos de absorbancia a 540 nm de ácido indol acético (ANEXO 5), se realizó la curva de calibración Figura 14 A, obteniendo por medio de la ecuación de la recta ($y = 0,0143x + 0,0141$) las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de AIA liberado luego de la reacción del reactivo de Salkowsky- H_2SO_4 con el AIA presente, los resultados de las absorbancias de las cepas evaluadas se extrapolaron frente a la curva para cada una así obteniendo la concentración específica en la producción de AIA (ANEXO 6).

Se puede evidenciar en la Figura 14 (B) que durante el crecimiento de las cepas la producción de AIA es muy variable para cada una, obsérvese que las cepas RBSF 23, RBSF 37 y RBSF 40 obtuvieron una concentración igual al del control positivo mostrando mayor producción de AIA por su capacidad como PGRP.

En la Figura 14 (C) se observa las absorbancias de las distintas cepas evaluadas y el control mostrando que la cepa RBSF 37 tuvo la mayor absorbancia y por ende una de las más altas concentraciones de AIA, así como las cepas RBSF 21, RBSF 23, RBSF 40, y RBSF 46; presentando una diferencia o igualdad con el control.

Así mismo se puede contemplar que las cepas RBSF 26, RBSF 03, RBSF 07, RBSF 09, RBSF 12, RBSF 13, RBSF 38, RBSF 43, RBSF 44, RBSF 33 y RBSF 36 indicaron concentraciones de AIA menores a 10 ug/ml al igual que sus absorbancias.

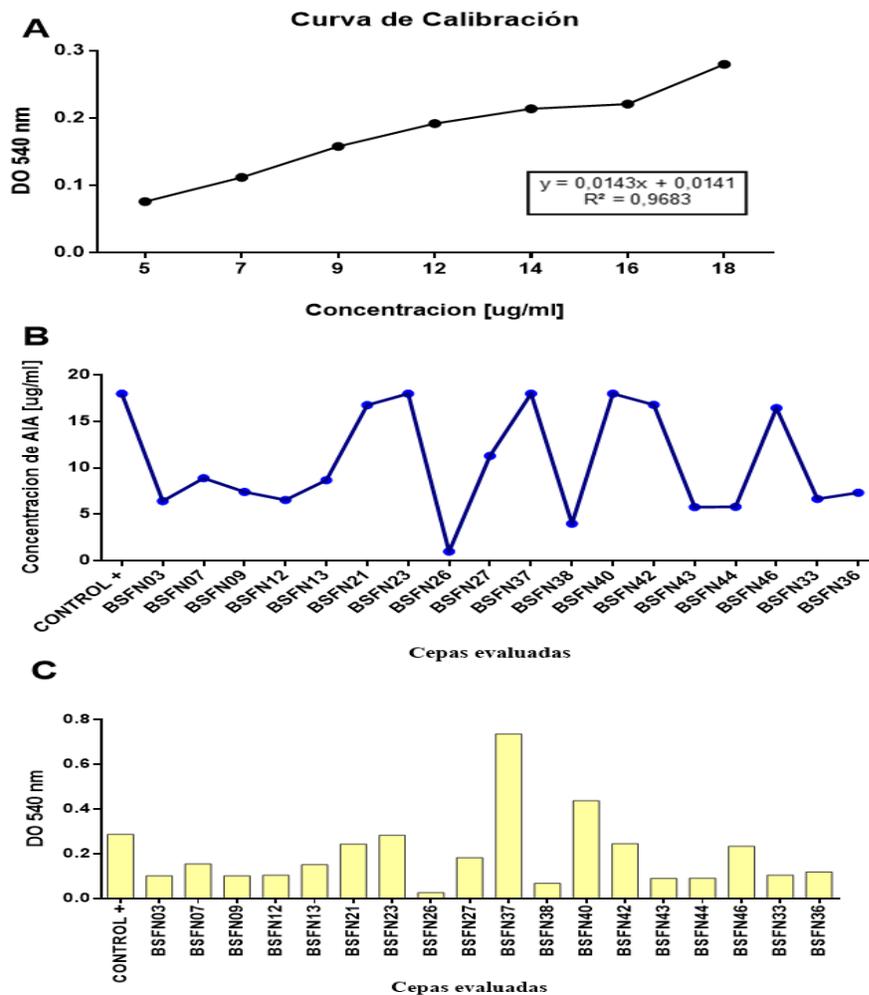


Figura 14. A. Curva de calibración ensayo AIA B. Concentraciones de AIA (Ácido Indol Acético) en las cepas evaluadas C. Absorbancia de cepas evaluadas con producción de AIA.

5.1.4 Pruebas de identificación de microorganismos Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

Se realizó un primer acercamiento hacia la identificación de las cepas evaluadas por el sistema de identificación BBL™ Crystal™ arrojando resultados en porcentaje de confiabilidad del 95,53% para la RBSF 21 reconocida como *Serratia marcescens*, la RBSF 23, RBSF 40, RBSF 46 *Enterobacter cloacae* con porcentajes de confiabilidad de 99,99%,98,55% y 98,86% respectivamente, y la RBSF 36 *Pantoea agglomerans* 96,93 %; además se realizó la identificación con el sistema MicroScan WalkAway plus software Lab Pro el cual indico la identificación de la cepa 21 y las demás cepas como *Enterobacter cloacae* con un porcentaje de confiabilidad de 99,9 %. Figura 15.

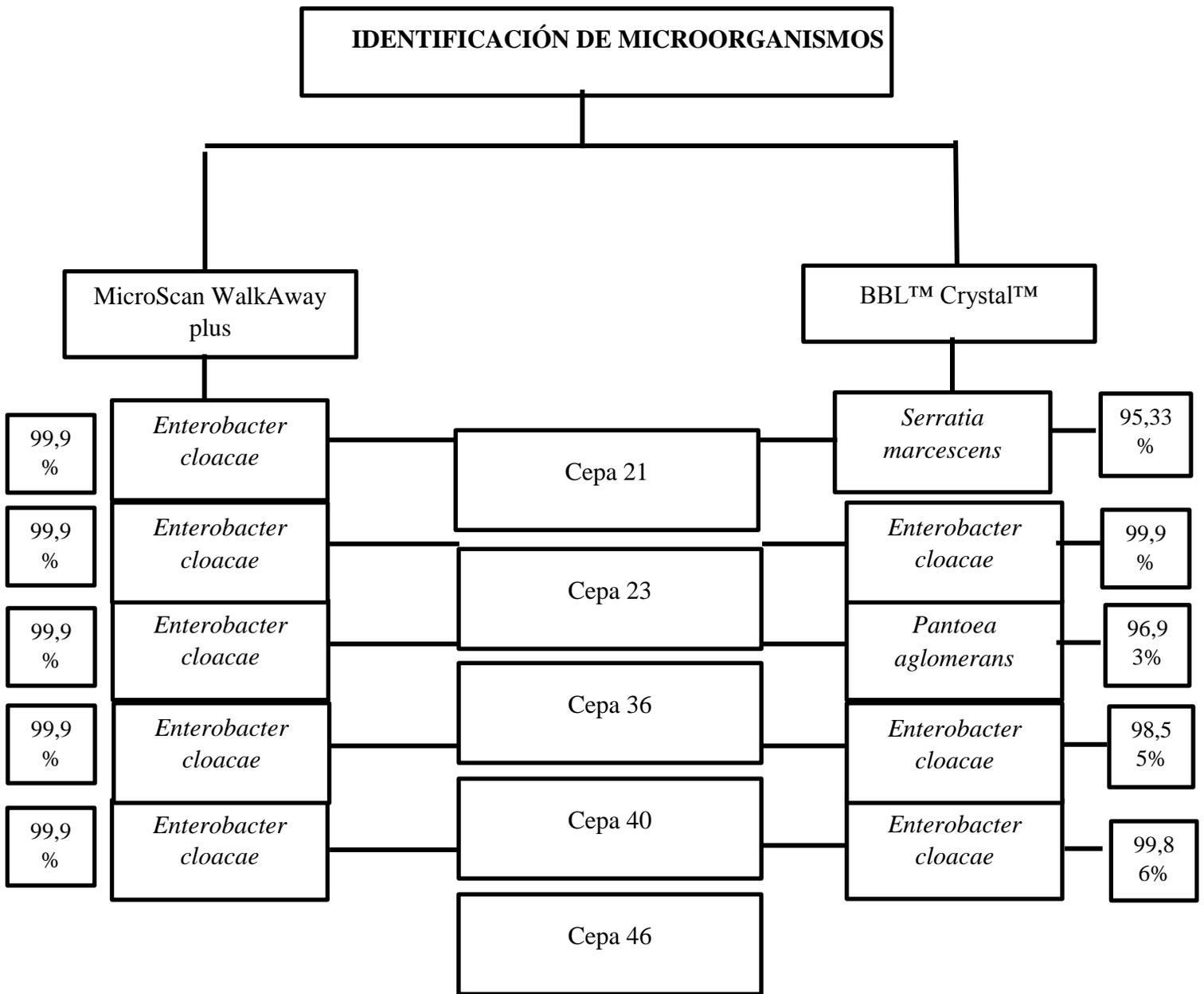


Figura 15. Identificación de las cepas RBSF 21, RBSF 23, RBSF 36, RBSF 40 y RBSF 46 por sistema BBL™ Crystal™ y MicroScan WalkAway plus.

5.1.5 Fase II. Evaluación de tratamientos inoculados a escala de vivero, inóculos y curva de crecimiento

A continuación, se presentan las curvas de crecimiento como resultado de los datos obtenidos durante la medición de las absorbancias y el aumento de población bacteriana en razón del tiempo (ANEXO 7); partiendo de una concentración celular ajustada según metodología y con un tiempo de generación celular aproximado de 1h. La fase de latencia se contempló en un intervalo de tiempo de 0 a 10 h, pero la fase exponencial inicio en el intervalo de 11 a 24h con una duración total de 13h tiempo para la mayoría de las cepas.

Se reconoció que el intervalo de tiempo de 10 a 30 h con una duración cercana a 20h, se da la fase estacionaria celular, útil en la preparación de los inóculos para cada una de las 5 cepas trabajadas; por último, para el tiempo 30 a 32 h se presenta una fase de muerte corta aproximadamente de minutos ya que reanuda su fase exponencial en los tiempos 32 a 48 h continuando con las demás fases de crecimiento.

El crecimiento medido de las cepas durante 72 h representó entre 2 a 3 fases exponenciales y 2 estacionarias continuando su reproducción después de dicho tiempo a excepción de la cepa RBSF 40; las cepas RBSF 21 y RBSF 23 mostraron un mismo intervalo de tiempo en la fase de latencia, pero para la fase exponencial de la primera cepa alcanzó 3 intervalos de tiempo dentro de la curva.

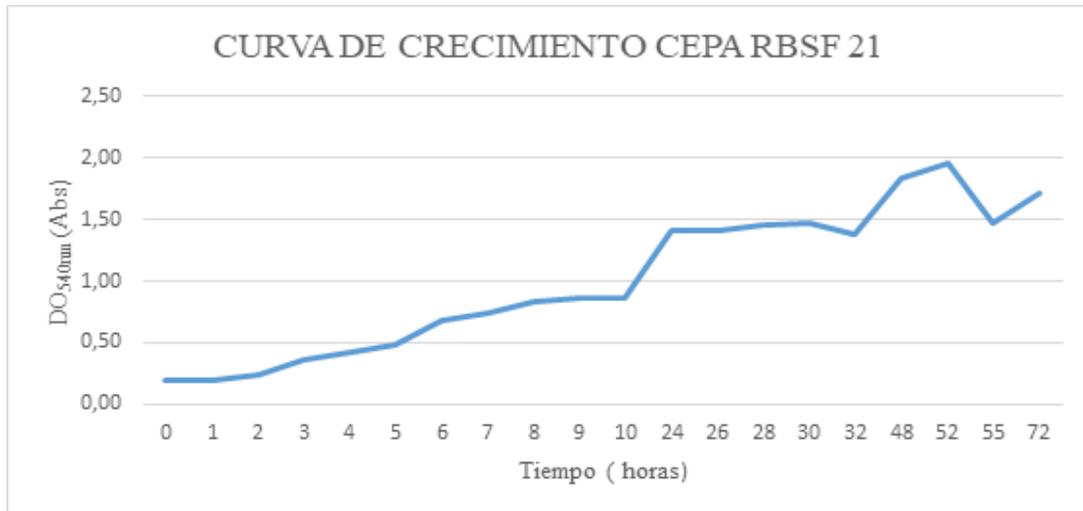


Figura 16. Curva de crecimiento cepa RBSF 21.

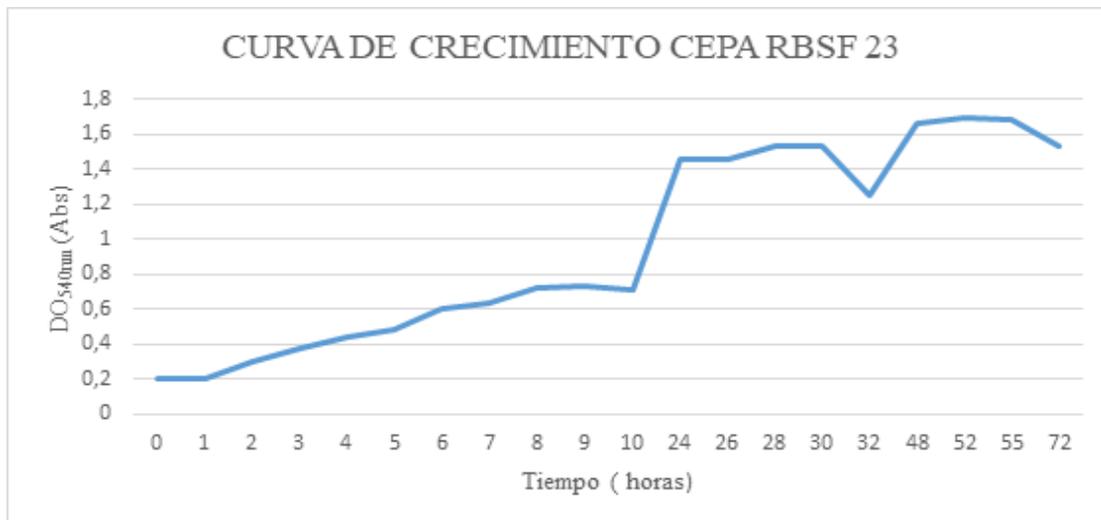


Figura 17. Curva de crecimiento cepa RBSF 23.

La cepa RBSF 36 presenta una fase de latencia irregular del punto 1 al 3 hace un aumento exponencial volviendo al estado de adaptación hasta el Tiempo de 10 h, la fase estacionaria presenta picos exponenciales, pero no se define que el microorganismo presente esta fase, se observa que es capaz de entrar a fase de muerte continuando en fase de latencia como parte de su crecimiento.

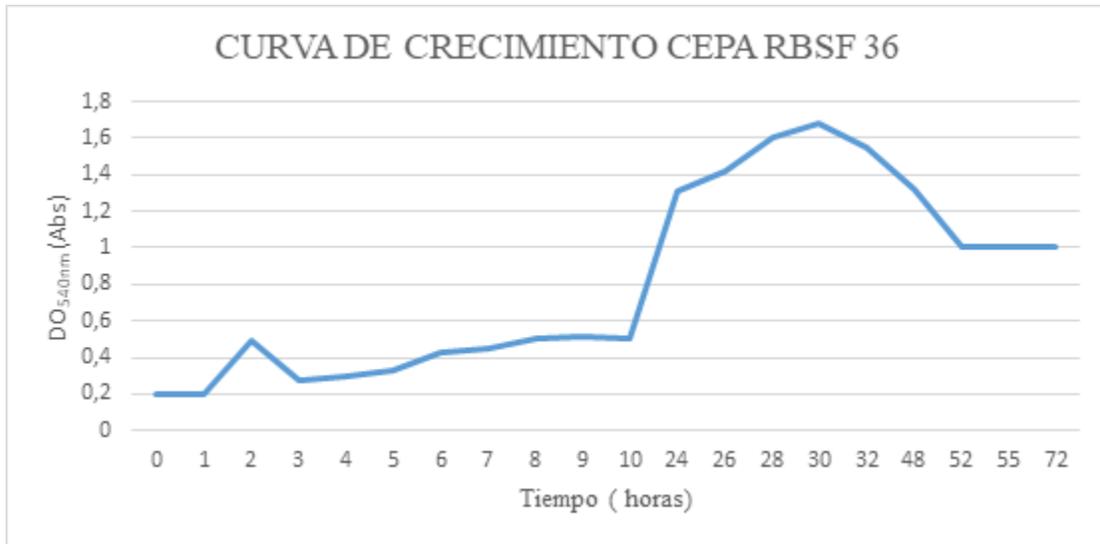


Figura 18. Curva de crecimiento cepa RBSF 36.

En cuanto a la cepa RBSF 40 fue la que más presentó cambios en su último intervalo de tiempo (55 a 72 h) puesto que disminuyó y detuvo su producción celular al entrar en fase de muerte que a diferencia de las demás cepas sus cultivos continuaron en estado exponencial aumentando su crecimiento.

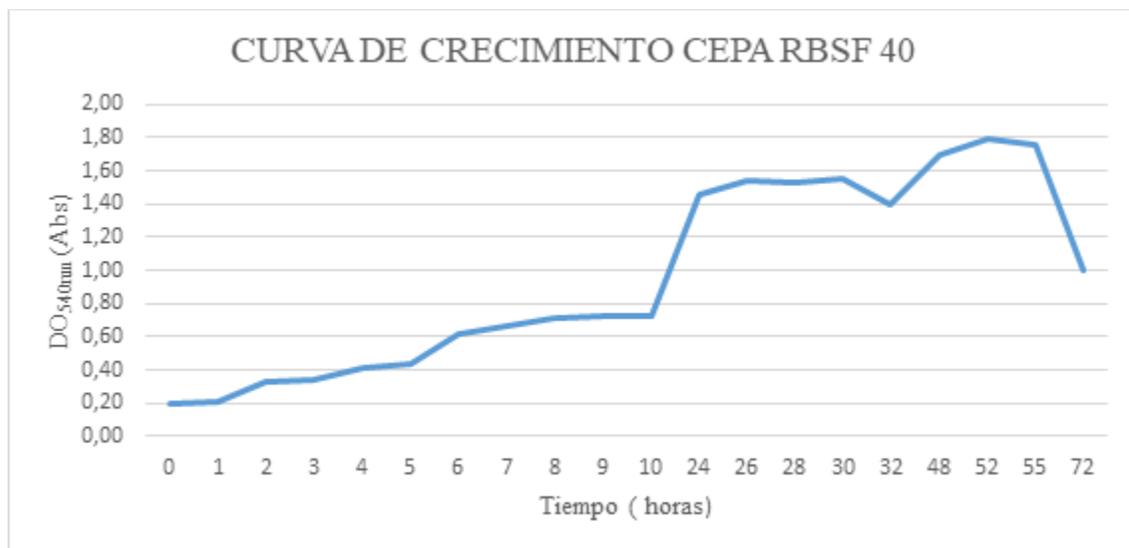


Figura 19. Curva de crecimiento cepa RBSF 40.

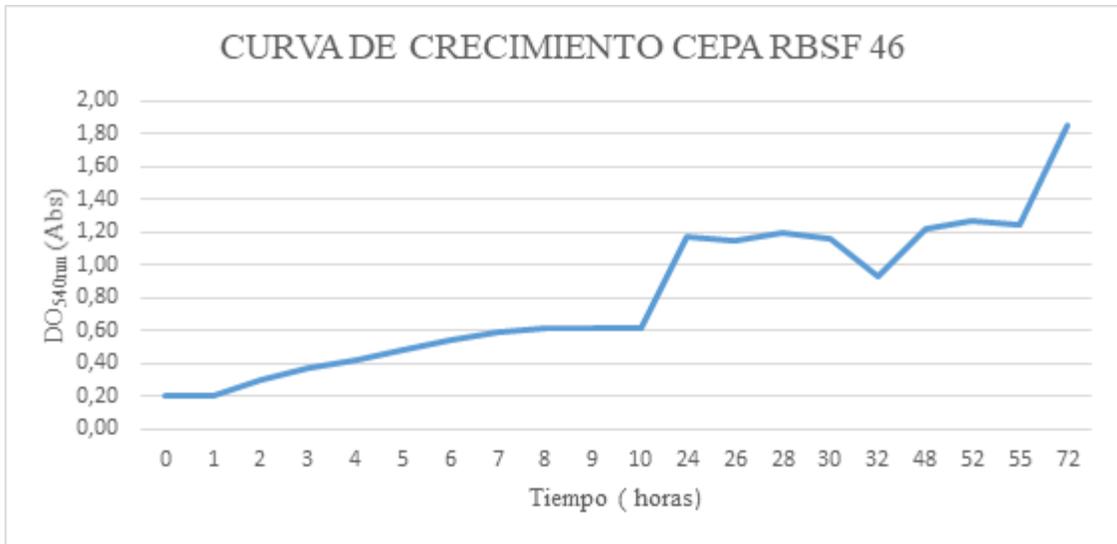


Figura 20. Curva de crecimiento cepa RBSF 46.

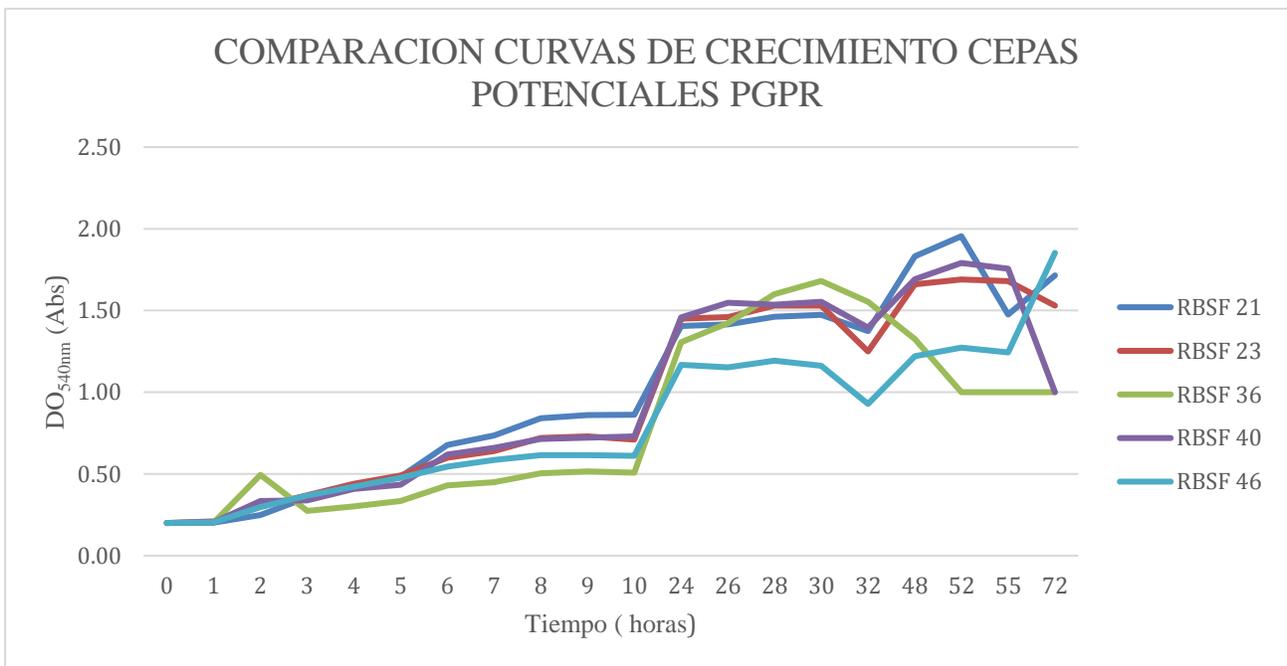


Figura 21. Comparación Curvas de crecimiento cepa de RBSF con capacidad PGPR.

En cuanto a la viabilidad y cinética de crecimiento de todas las cepas RBSF, se puede observar tanto en las curvas como en la comparación una tendencia durante la fase de latencia

igual (0,2 a 0,611 DO) para todas las cepas, aunque la cepa RBSF 36 tuvo un aumento no significativo durante la fase, llego a tener el mismo comportamiento con respecto a las demás cepas (Figura 21).

Durante la fase exponencial las cepas que más se destacaron por presentar mayores valores para los tiempos de incubación fueron RBSF 21, RBSF 23, RBSF 40 y RBSF 36, sin embargo, esta tercera cepa presento intervalos de crecimiento dentro de la misma fase que luego la llevaron a disminuir su crecimiento y entrar a un tiempo de incubación más temprano en fase de muerte; pero para la cepa RBSF 46 pese a que su fase exponencial fue baja (1,168 a 1,163 DO) comparada a las 4 cepas trabajadas, para el tiempo de 55h logra entrar en una fase exponencial mayor (1,243 a 1,853 DO) con respecto a las cepas.

5.1.6 Bioensayo en vivero

Luego de la preparación de los pre inóculos bacterianos, el volumen total utilizado fue de 200 ml (Figura 22) para cada una de las plantas según especie, inoculadas con una cantidad de 20 ml para los 5 tratamientos de Tibar y Raque (Figura 23). El suelo usado para la siembra de las plántulas fue suelo orgánico de Usme.



Figura 22. Preparación de los inóculos para los tratamientos.



Figura 23. Inoculación de las plantas según los tratamientos.

Durante los 7 tiempos evaluados en los 90 días de medición, para los tiempos 0, 1 y 2 no se obtuvieron cambios notorios en el crecimiento vegetal frente a las variables medidas como número de hojas, altura y grosor del tallo dándose las mismas proporciones para los 5 tratamientos en los dos últimos tiempos en cada cepa tanto para Raque como para Tibar; en el estado físico se reconocen cambios foliares en los tratamientos 2,3 y 4 en la especie *Vallea stipularis* debido a la presencia de manchas amarillas en más de dos hojas y clorosis en 2,3 hasta 4 hojas siendo las plantas inoculadas como las 1,2,3,4 del control (Figura 24 (E)) por otro lado la especie *Escallonia paniculata* presentó un buen estado foliar y físico (Figura 24 (B,D,F))

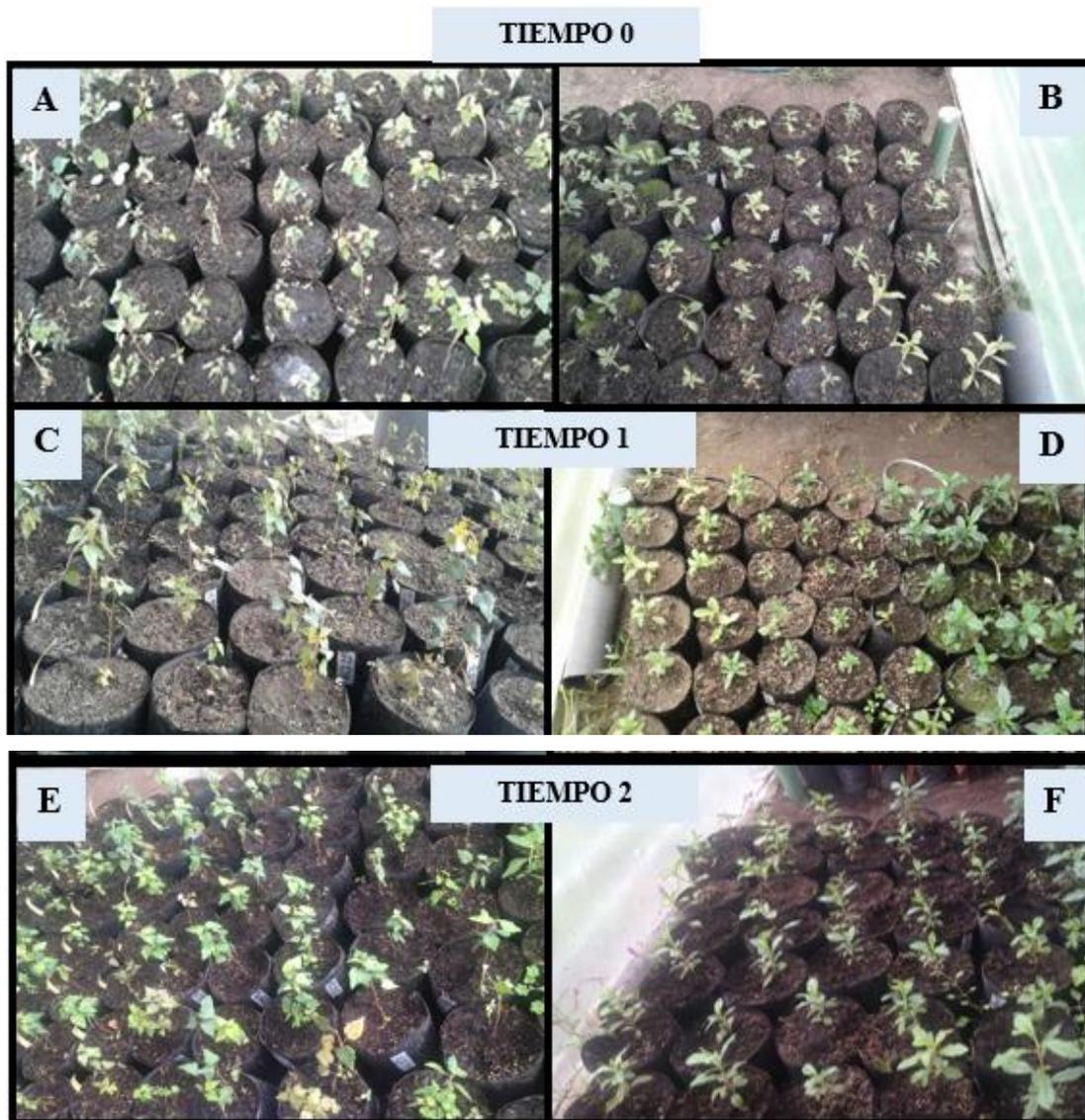


Figura 24. Tiempo 0 (A,B), Tiempo 1 (C-D) y Tiempo 2 (E-F) de los 5 tratamientos A,C,E Raque, B,D,F Tibar

En la Figura 25 se muestra que a partir del Tiempo 3 se dan los cambios significativos de crecimiento entre los tratamientos en las plantas de Tibar como de Raque, para las plantas de Tibar se observa claramente el aumento foliar y esbeltez vegetal en las plantas inoculadas frente a los controles. El control número 6 de Tibar presentó marchitez foliar a partir del Tiempo 2 (Figura 24 (A)).

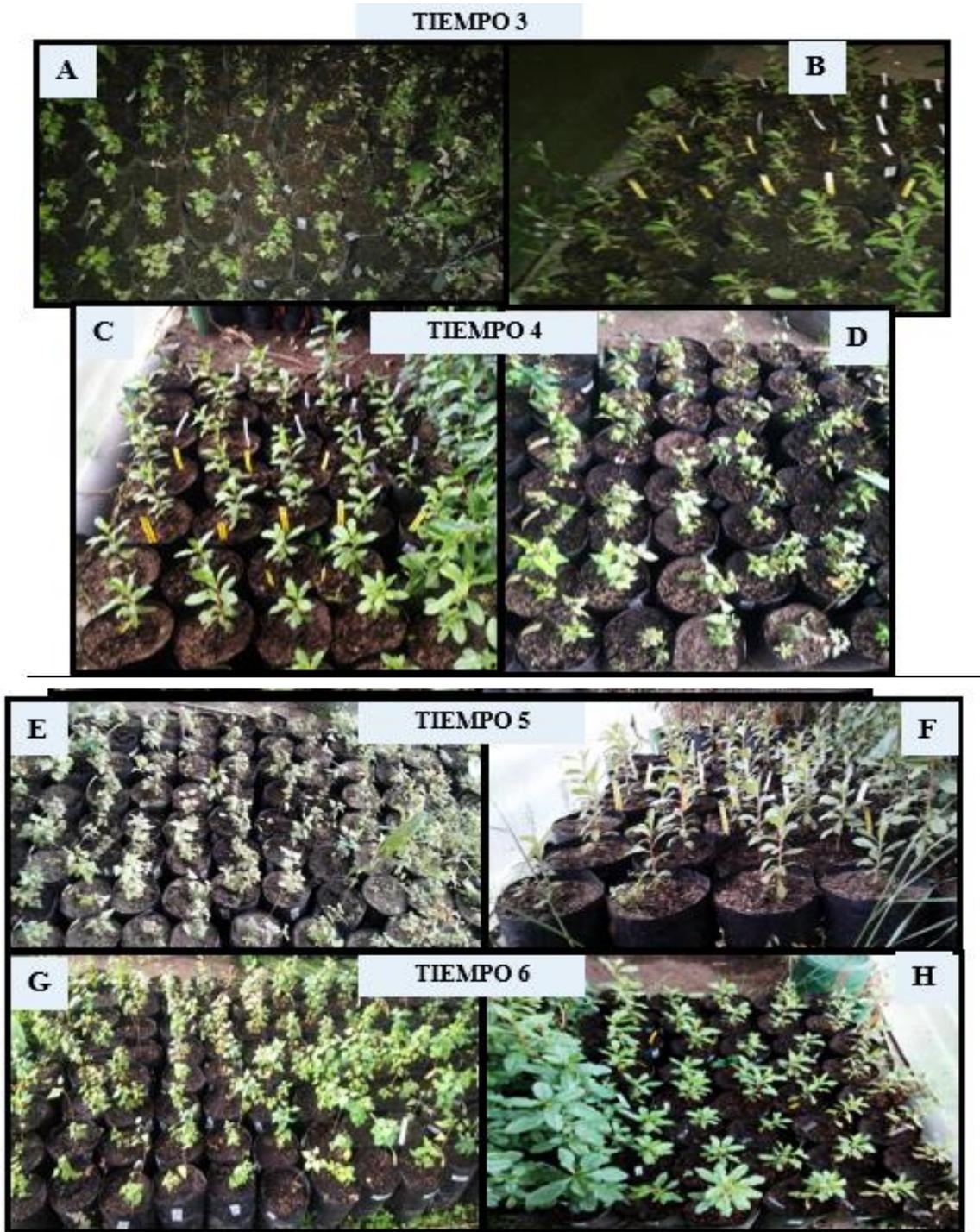


Figura 25. Tiempo 3 (A,B), Tiempo 4 (C-D),Tiempo 5 (C-D) y Tiempo 6 (C-D) de los 5 tratamientos A-D-E-G Raque, B-C-F-H Tibar.

Para los tiempos 4, 5 y 6 el aumento del crecimiento y esbeltez vegetal continua progresivamente para los 5 tratamientos de Tíbar, el control 6 presentó enrollamiento foliar a partir del Tiempo 3 (Figura 26 (B)) y continuó con la afectación foliar hasta el último tiempo medido (Figura 26 (C)).

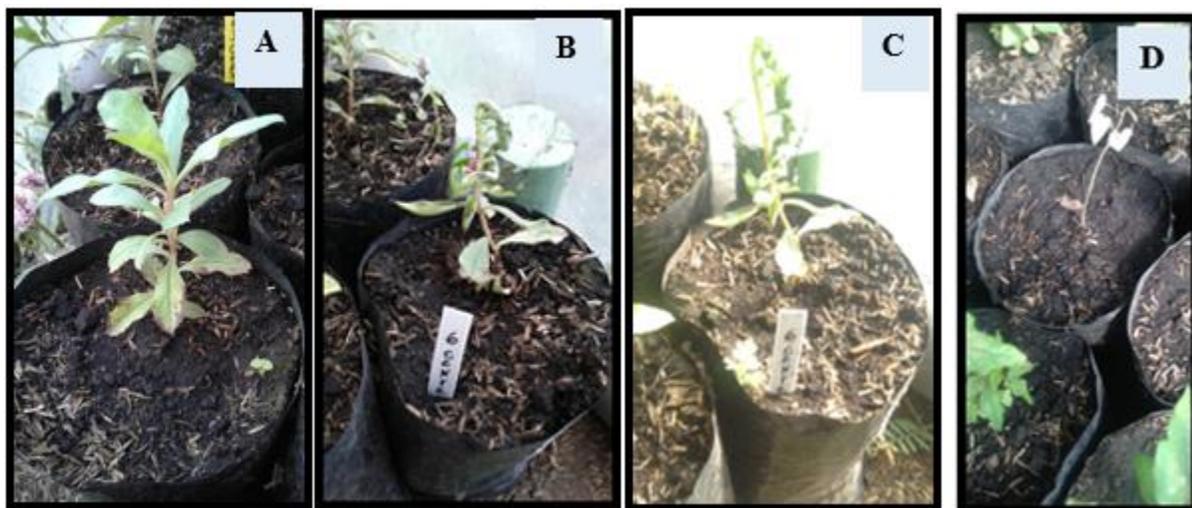


Figura 26. Enrollamiento hojas control 6 para Tíbar, Tiempo 2(A), 3(B),4(C); D Tiempo 4 cepa RBSF 21 planta Raque.

Las plantas de los tratamientos de Raque continuaron deteriorándose con el aumento de marchitez y clorosis foliar durante el Tiempo 4 para los tratamientos 1, 2 y 3 (Figura 25 (D)), para el Tiempo 5 la planta número 1 del tratamiento 1 presentó marchitez total de las hojas y al Tiempo 6 muere totalmente manteniendo sus datos de las variables constantes desde dicho tiempo (Figura 26 (D)).

5.1.8 Análisis de datos estadísticos de varianza

5.1.8.1 Altura Tibar (*Escallonia paniculata*)

Con respecto a la altura de las plántulas de la especie Tibar (*Escallonia paniculata*) se encontró que a pesar de que presentó crecimiento (ANEXO 8), no hubo diferencias estadísticas con respecto a las plántulas control (Figura 27).

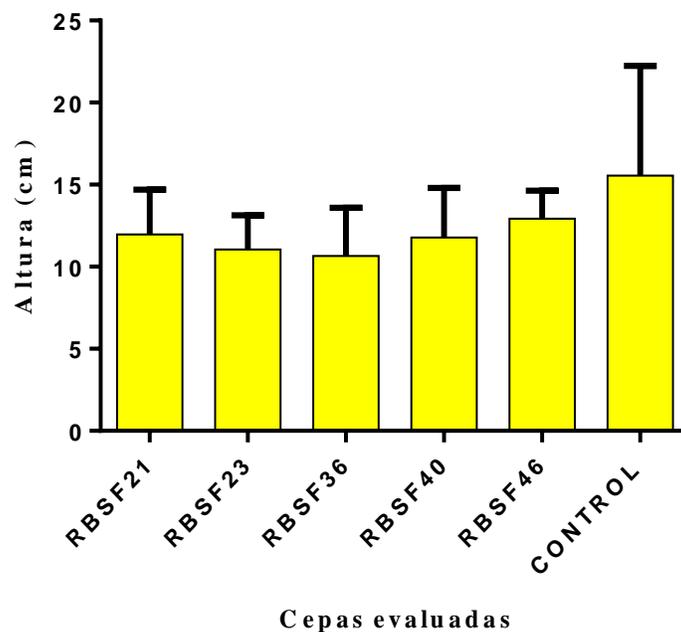
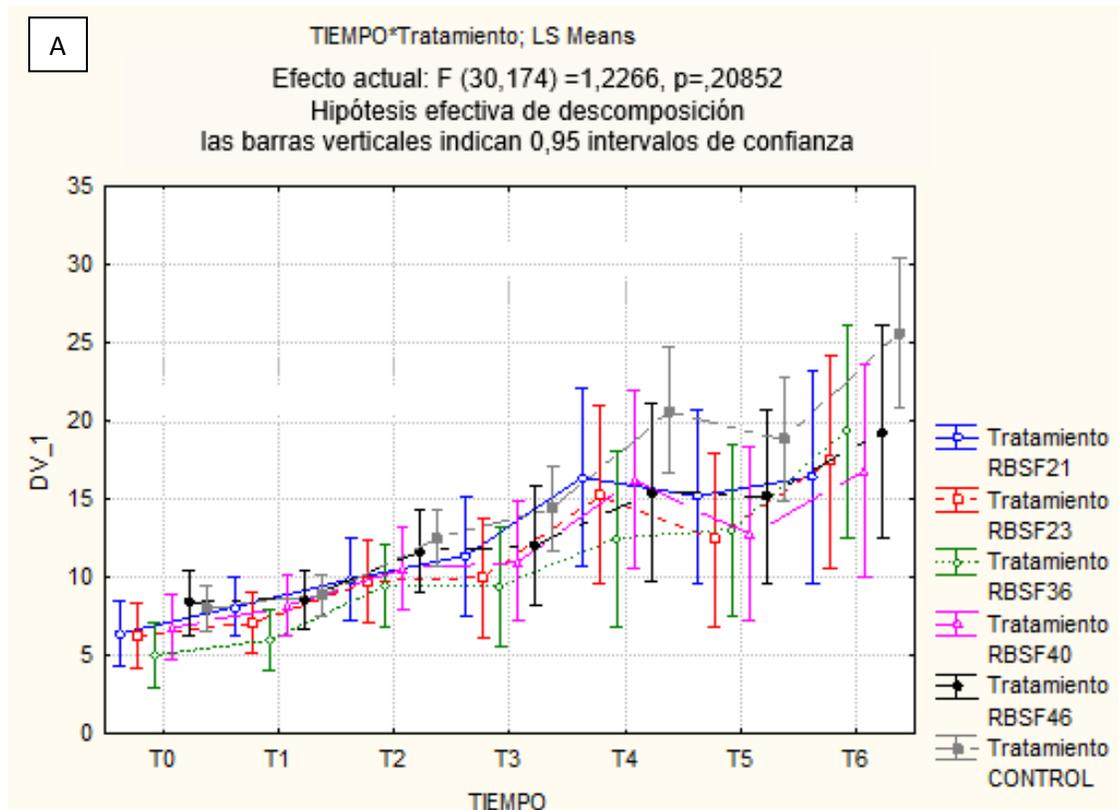


Figura 27. Análisis estadístico Altura planta Tibar (*Escallonia paniculata*). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.

Al realizar el análisis de varianza no se presentó alguna diferencia significativa entre tratamientos y el control (Figura 28A). Además, el valor de P fue mayor de 0.05, la diferencia entre tratamientos fue de $0,19 > 0,05$ y la diferencia entre tratamientos por tiempo fue de $0,20 > 0,05$; es decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable Altura en las plantas de Tibar, con un nivel del 95.0% de confianza. (Figura 28 B)



B

Analisis de varianza de medidas repetidas
 Hipótesis efectiva de descomposición

Efecto	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		

Figura 28. Análisis estadístico Altura planta Tibar (*Escallonia paniculata*). **A.** Gráfico y tabla de varianza para Altura a lo largo del tiempo entre los diferentes tratamientos y control. **B** Tabla de análisis de varianza

5.1.8.2 Número de hojas planta Tibar (*Escallonia paniculata*)

Todos los tratamientos y los controles presentaron un incremento en el desarrollo del follaje sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre los controles y los tratamientos (Figura 29).

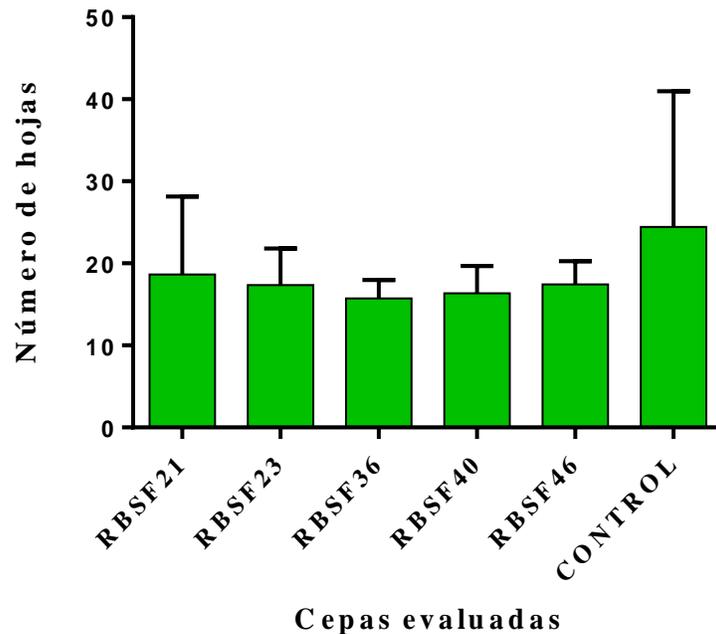
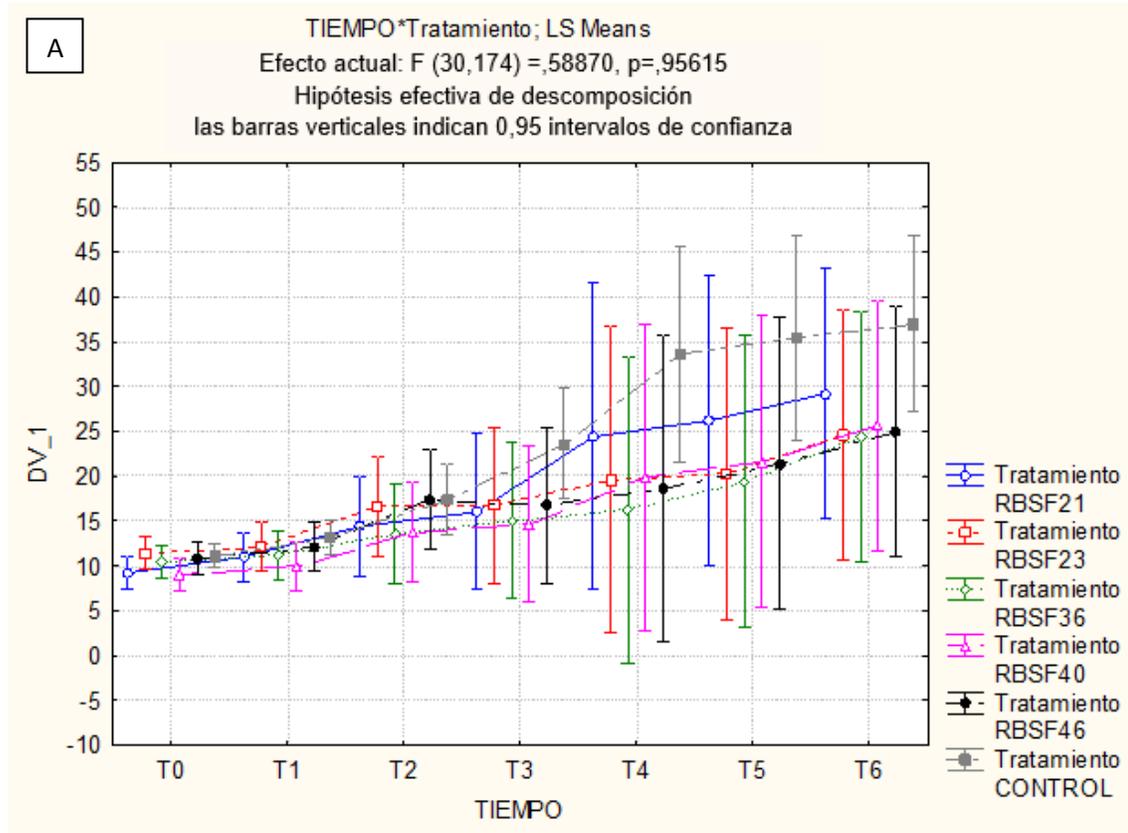


Figura 29. Análisis estadístico Número de hojas planta Tibar (*Escallonia paniculata*). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.

Se observó que tampoco se presentaron diferencias significativas a lo largo de los 7 muestreos (Figura 29 A); En la tabla del análisis de varianza (Figura 29 B) se evidencia que el valor de P es mayor que 0.05 la diferencia entre tratamientos fue de $0,29 > 0,05$ y la diferencia entre tratamientos por tiempo fue de $0,95 > 0,05$; es decir que no hubo diferencias para la variable número de hojas Tibar entre un Tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.



B

Análisis de varianza de medidas repétidas
Hipótesis efectiva de descomposición

Efecto	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		

Figura 30. Análisis estadístico Número de hojas planta Tibar (*Escallonia paniculata*). **A** Gráfico de varianza para número de hojas a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. **B** Tabla de análisis de varianza

5.1.8.3 Grosor del tallo planta Tibar (*Escallonia paniculata*)

En el tiempo evaluado se presenta un aumento en el grosor del tallo para los tratamientos, así como los controles, pero se evidencia que no hay diferencias significativas (Figura 31).

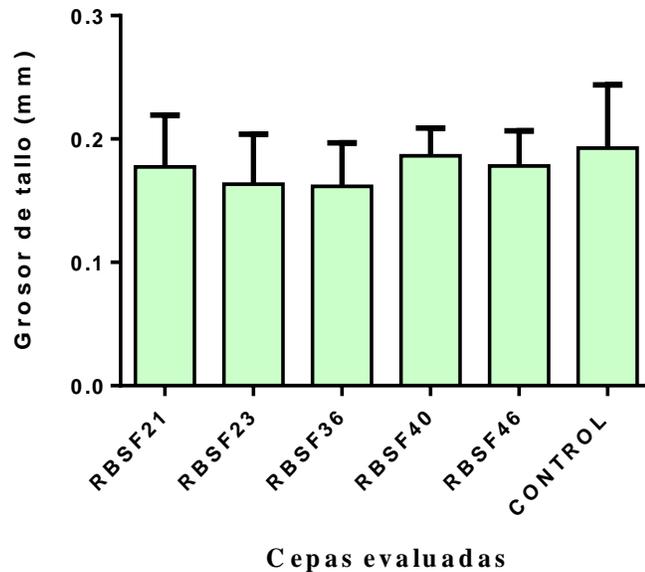


Figura 31. Análisis estadístico Grosor del tallo planta Tibar (*Escallonia paniculata*). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.

Al realizar el análisis de varianza para identificar diferencias entre tratamientos se puede observar que no existen diferencias para la variable grosor de tallo (Figura 32 A); la tabla de varianza (Figura 32 B) expone que el valor de P es mayor que 0.05 la diferencia entre tratamientos fue de $0,32 > 0,05$ es decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Grosor del tallo Tibar entre tratamientos, sin embargo la diferencia entre tratamientos por tiempo fue de $0,00 < 0,05$ es decir que si existió una diferencia significativa, la cual se puede observar en los primeros quince días. Con un nivel del 95.0% de confianza.

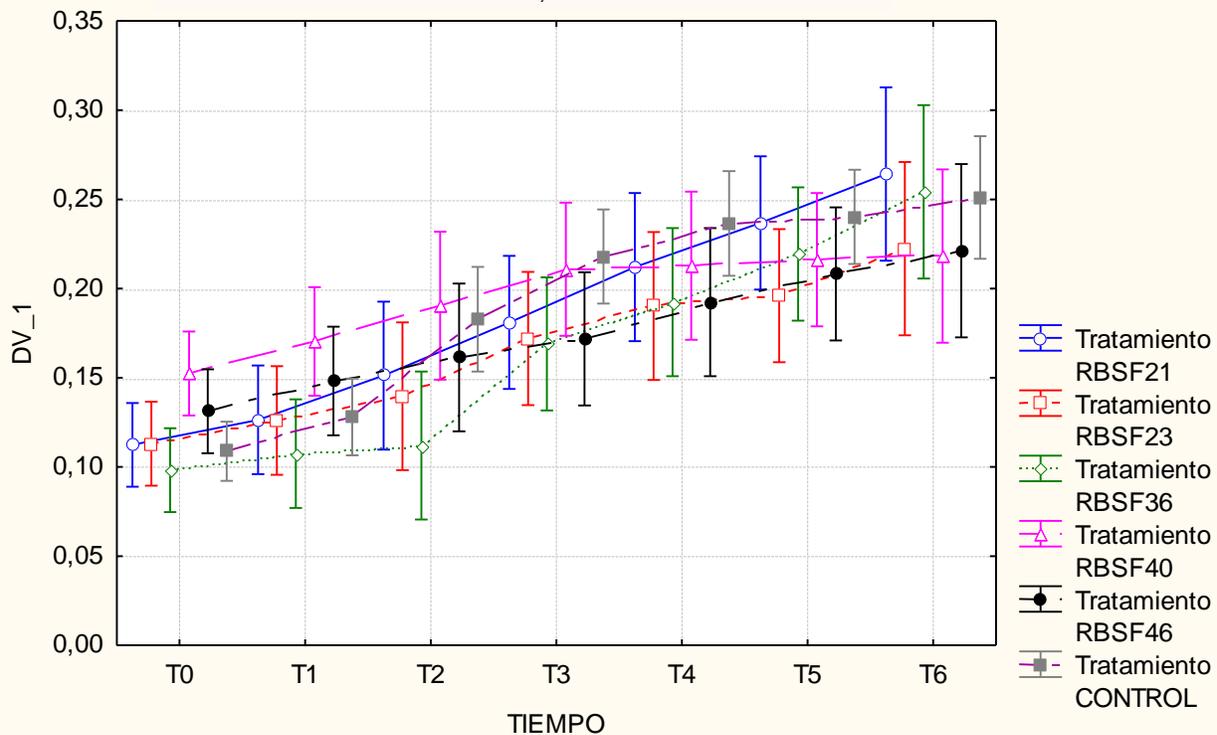
A

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



B

Análisis de varianza de medidas repetidas
Hipótesis efectiva de descomposición

Efecto	SS		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		

Figura 31. Análisis estadístico Grosor del tallo planta Tibar (*Escallonia paniculata*) A Gráfico de varianza para número de hojas a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. B Tabla de análisis de varianza

5.1.8.4 Altura planta Raque (*Vallea stipularis*)

En el tiempo de evaluación de la variable altura de la especie Raque (*Vallea stipularis*) se evidenció incremento en los tratamientos, sin embargo no presentó diferencia significativa con respecto a las plántulas control (Figura 33).

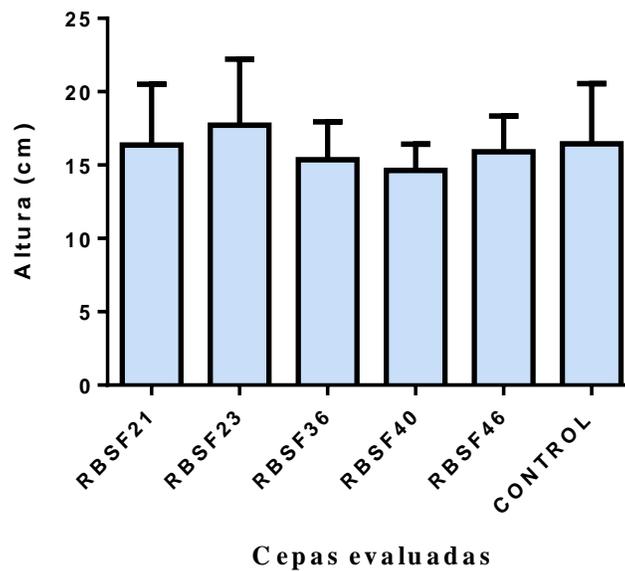
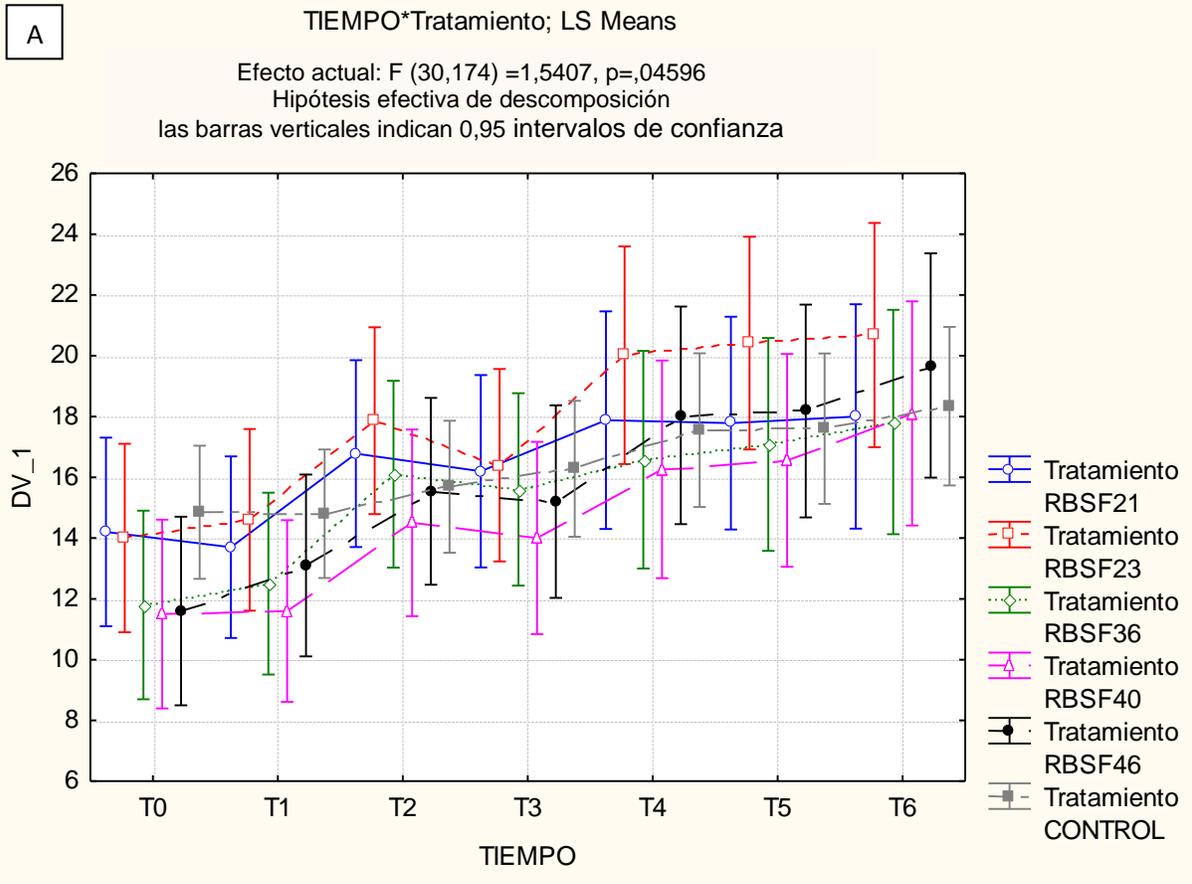


Figura 33. Análisis estadístico Altura planta Raque (*Vallea stipularis*). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.

Así mismo, se evidencio que no existe diferencia significativa entre tratamientos y el control (Figura 34 A), se puede observar que el valor de P fue mayor de 0.05, la diferencia entre tratamientos fue de $0,77 > 0,05$ es decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable Altura en las plantas Raque; sin embargo la diferencia entre tratamientos por tiempo fue de $0,04 < 0,05$; es decir que si muestra una diferencia significativa.



B

Análisis de varianza de medidas repetidas
 Hipótesis efectiva de descomposición

Efecto	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		

Figura 34 Análisis estadístico Altura planta Raque (*Vallea stipularis*) **A** Gráfico de varianza para Altura a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. **B** Tabla de análisis de varianza

5.1.8.5 Número de hojas planta Raque (*Vallea stipularis*)

El análisis de varianza para la variable número de hojas planta Raque (*Vallea stipularis*) manifiesta que, aunque hubo aumento en el follaje de las plántulas no hubo diferencias significativas (Figura 36).

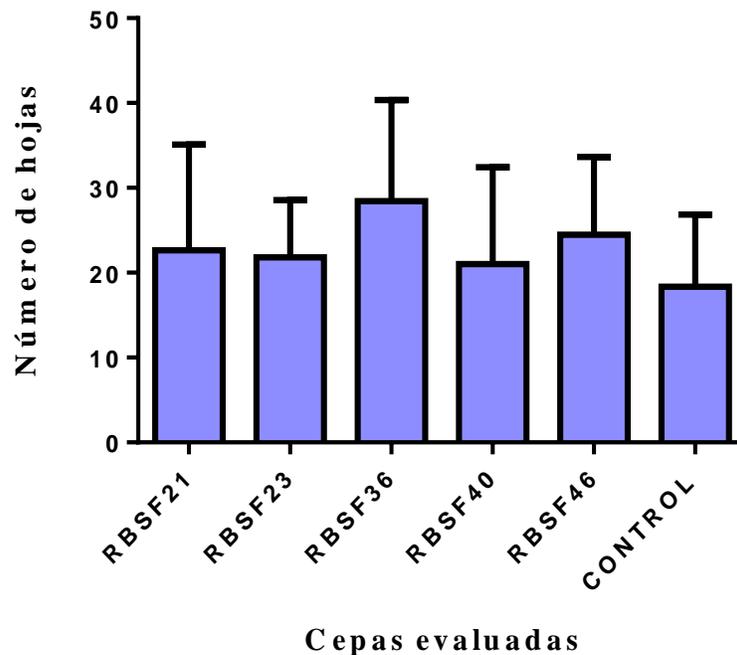
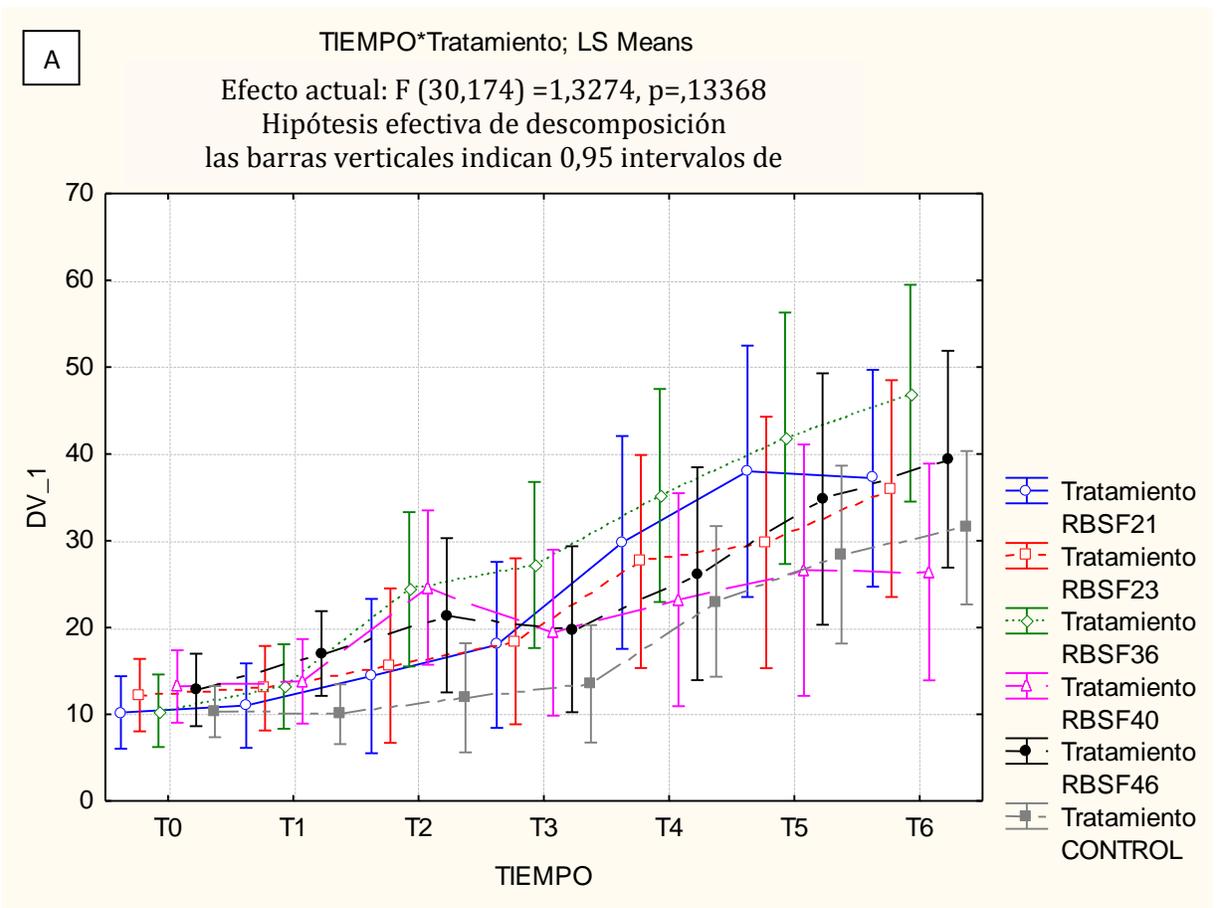


Figura 35. Análisis estadístico Número de hojas planta Raque (*Vallea stipularis*). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.

Así mismo no hubo diferencias entre tratamientos y controles a lo largo de los 7 muestreos (Figura 36 A), en la tabla del análisis de varianza se observa que el valor de P es mayor que 0.05, entre tratamientos fue de $0,46 > 0,05$ y el valor entre tratamientos por tiempo fue de $0,13 > 0,05$ es decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Número de hojas Raque entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. (Figura 36B).



B

Análisis de varianza de medidas repetidas
Hipótesis efectiva de descomposición

Efecto	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		

Figura 36. Análisis estadístico Número de hojas planta Raque (*Vallea stipularis*). Gráfico de varianza para número de hojas a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. **B.** Tabla de análisis de varianza

5.1.8.6 Grosor de tallo planta Raque (*Vallea stipularis*)

Para la variable Grosor de tallo planta Raque (*Vallea stipularis*) se observó que los tratamientos presentaron un aumento en el grosor del tallo en los 7 tiempos evaluados así como los controles pero no existe diferencia significativa entre ellos (Figura 37)

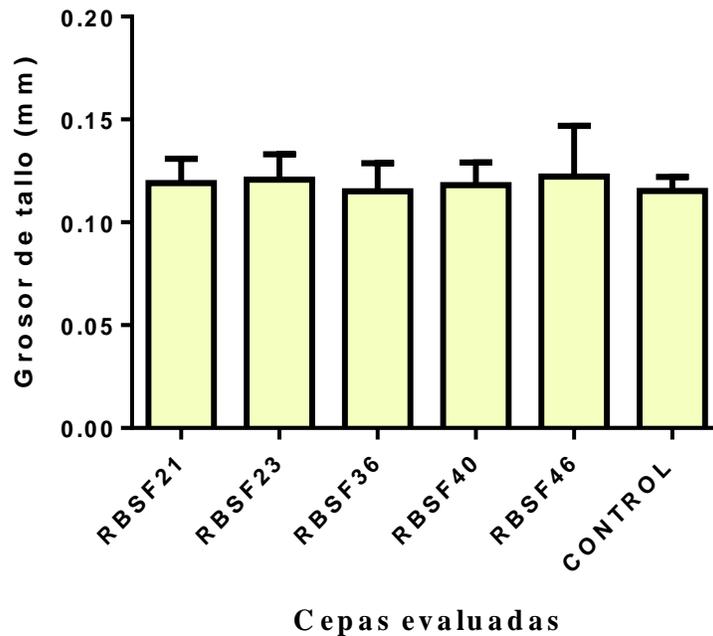


Figura 37. Análisis estadístico Grosor de tallo planta Raque (*Vallea stipularis*). Gráfico de medias y desviación estándar tratamientos evaluados y controles. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media.

Al realizar el análisis de varianza para identificar diferencias entre tratamientos se puede observar que no hubo diferencias entre tratamientos y controles (Figura 38A), en la tablade varianza (Figura 38B) se evidencia que el valor de P es mayor que 0.05, la diferencia entre tratamientos fue de $0,70 > 0,05$ y la diferencia entre tratamientos por tiempo fue de $0,75 > 0,05$; es decir que no hubo diferencia para la variable grosor del tallo Raque entre tratamientos , con un

nivel del 95.0% de confianza.

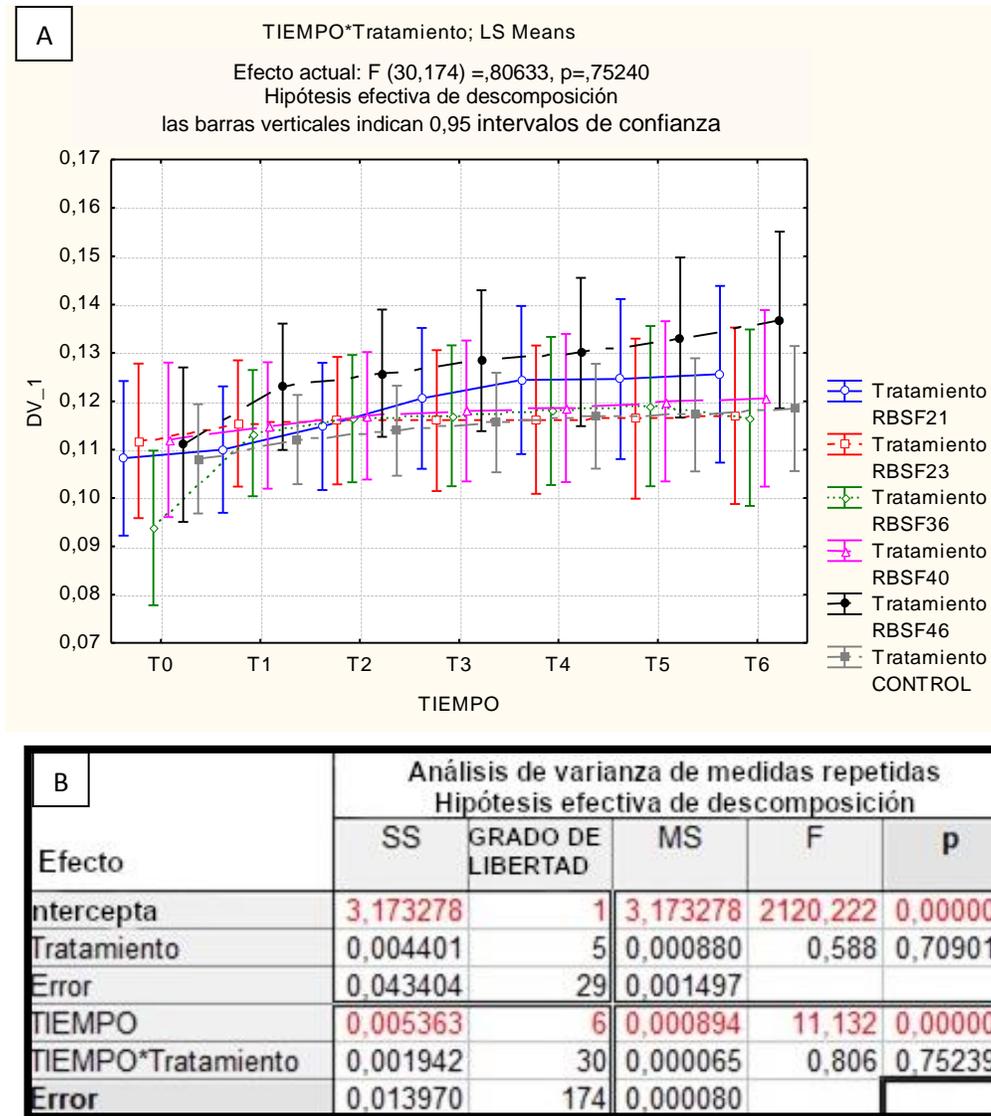


Figura 38. Análisis estadístico Grosor del tallo planta Raque (*Vallea stipularis*) **A** Gráfico de varianza para grosor de tallo a lo largo del tiempo entre diferentes tratamientos y control. **B.** Tabla de análisis de varianza.

6. DISCUSIÓN

La recuperación de rizobacterias solubilizadoras de fósforo en suelos de Bosque Alto Andino para la mayoría de ecosistemas forestales y cultivos agrícolas son reportadas en predominancia por bacterias Gram negativas, aunque el mayor porcentaje de microorganismos que solubilizan fósforo se aíslan de la rizósfera de las plantas (53), puesto que los aislados de suelos afectados por la actividad humana y/o erosión llegan a considerarse como fuentes útiles y abundantes en el aislamiento de dichos microorganismos.

El aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo es de las alternativas más reconocidas actualmente con la implementación de proyectos para la restauración ecológica de corredores biológicos según Resnatur (grupo de la ASOCIACIÓN RED COLOMBIANA DE RESERVAS NATURALES DE LA SOCIEDAD CIVIL), ya que para el 2014 Beltrán encontró 130 aislados bacterianos con capacidad solubilizadora en suelos del oriente de Venezuela y en vista que las cepas aisladas de los dos tipos de suelo utilizados llegaron a un valor de 44 colonias puras se confirma la existencia de una biodiversidad microscópica en el suelo tan alta para el uso en proyectos ambientales (22)

Reconociendo que el 99,9 % de las cepas utilizadas en el presente estudio corresponden a los géneros de *Enterobacter cloacae* y *Pantoea agglomerans* y que en estudios por Nieto y Szpinak quienes para el 2017 reportan bacterias del suelo de los géneros *Enterobacter* y *Serratia* como microorganismos capaces de solubilizar fosfato a partir de diferentes fuentes orgánicas. Así mismo reportan que por otra parte, *Pantoea* que ha demostrado poseer múltiples atributos en el desarrollo vegetal, como actividad solubilizadora de fosfato, siderófora y producción de ácido acético (54), otros investigadores en Korea, Irán y Venezuela también demostraron lo mismo con

respecto a la especie *P. agglomerans*, la cual además se ha visto, junto a otras especies de *Pantoea*, que produce la enzima fitasa, encargada de degradar fitato; la forma de sal del ácido fítico el cual constituye hasta el 90% del fósforo natural.(55, 56)

Las propiedades de solubilización que presentan los microorganismos se deben a diversos mecanismos, uno de estos es la producción de ácidos orgánicos evidenciándose con la formación de halos en el medio de cultivo NBRIP y en los medios trabajados (SMRS-1, PSM, Pikovskaya), estos mismos presentados por las 5 cepas seleccionadas por su mayor índice de solubilización (IS:>45%). (55)

No obstante se reconoce que casos como el de la cepa RBSF 39 que no presentó halo de solubilización en la prueba en medio NBRIP pero fue capaz de solubilizar fosfato en los medios trabajados durante el proyecto pero a pesar de esto y según Reyes se ha demostrado que la ausencia de halos pero un crecimiento positivo podría interpretarse como una disolución ocasionada por la extrusión de protones al asimilarse otro nutriente del medio dentro de la célula. (21)

Por otro lado algunos investigadores han encontrado resultados contradictorios entre el método de detección del halo NBRIP y la solubilización de fosfato en cultivos sólidos, ya que muchos microorganismos no originan halos en medios sólidos, pero pueden solubilizar varios tipos de fosfatos en medios líquidos, así que la formación de halos permite predecir macroscópicamente las posibilidades de estos microorganismos de solubilizar diferentes tipos de fósforo pero no garantizar que no hagan una solubilización de fosfato metabólica (53, 57).

El ensayo de ácido indol acético pone en manifiesto la presencia de reguladores de crecimiento vegetal (PGPRs) en las cepas RBSF 23, RBSF 37 y RBSF 40, lo cual indica que

pueden influenciar positivamente en el crecimiento de las plantas con respecto al intervalo de tiempo de exposición que lleve con el inóculo viable (28) y aunque todas las cepas evaluadas demostraron presencia de auxinas se afirma que todas las cepas son un coadyuvando en el crecimiento vegetal.

Estudios como el de Benjumea- Pajuelo y Vega, Canchignia y colaboradores, han descrito que la concentración de AIA se encuentra controlada en la planta pero así mismo se ha demostrado que las rizobacterias tienen la capacidad de modular los niveles del mismo; está involucrado en el crecimiento y desarrollo de las plantas, división celular, diferenciación de tejido y respuesta de defensa, entre otras (45), es decir que para la cepa RBSF 37 que presentó una mayor concentración de AIA fue la mayor coadyuvadora en el crecimiento de las plantas usadas.(58, 62)

En cuanto a la selección de las especies vegetales a trabajar durante el presente estudio ha reconocido que llegan a ser modelos viables con uso en restauración ecológica, dado que Rodríguez y Vargas consideran que *Vallea stipularis* constituye una de las especies leñosas nativas clave para la restauración por su capacidad de adaptación frente a condiciones adversas con microclima variable dependiendo de los factores externos y competitividad no invasora capaz de competir por recursos con la edad adecuada (59).

Del mismo modo Melo, Rodríguez y Rojas reconocen que *Escallonia paniculata* por ser arbusto leñoso logra crecer en entornos ambientales con altas restricciones para el desarrollo, ya que para lograr lo anterior, estas especies arbustivas han generado una alta diversidad foliar como estrategia adaptativa al régimen de luz cambiante, basada principalmente, en el tamaño y grosor de las hojas, lo que constituye las variables de medición del presente estudio. (60)

Las dos especies evaluadas se vieron condicionadas bajo factores como la temperatura, humedad y riego que influyeron en el crecimiento y perdurabilidad de la planta, caso dado en control número 6 de *Escallonia paniculata* la cual sufrió un enrollamiento foliar durante el bioensayo, según Masabni y colaboradores esto puede deberse al calor y la baja humedad que hacen que las hojas se sequen, luego se doblen y se enrollen como respuesta de autodefensa; al compararse con las plantas de los tratamientos ninguna presentó este signo fisiológico ni se afectó el tiempo y desarrollo vegetal, sin embargo, se evidenciando la actividad promotora de los PGPR además de considerarse controladoras de factores bióticos llegan a cumplir roles de protección frente a abióticos del ambiente de cada uno de los tratamientos. (61)

La edad de las plantas llegó a ser una de las condiciones más importantes frente al manejo, puesto que la especie *Vallea stipularis* siempre presentó en promedio valores bajos de altura (15 a 16 cm) y número de hojas (16 a 23 hojas) en los 5 tratamientos trabajados (T1,T2,T3,T4,T5), frente a las 5 cepas utilizadas (RBSF 21, RBSF 23,RBSF 36,RBSF 40,RBSF 46) que no representaron y esta fisiológico constantemente la aparición de clorosis, marchitez foliar hasta causar la muerte de una de las plantas, la extrafoliación no permitió avances significativos en el crecimiento vegetal, debido a la presencia de más de un brote en su tallo puesto que necesita de más esfuerzo fotosintético.(49)

El periodo de tiempo de 4 meses en el que se realizó el bioensayo y se analizaron las variables fue muy corto, teniendo en cuenta los resultados de desarrollo de las especies vegetales, por ejemplo la altura que pueden llegar alcanzar *Vallea stipularis* y *Escallonia paniculata* es de 15m cada una, en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio no se evidenciaron resultados estadísticamente significativos.

Por las características del tipo de organismos plantas (árboles nativos), no se alcanza a

detectar el efecto positivo de los inóculos bacterianos lo que supone disponer de tiempos mas largos de muestreo y seguimiento de las variables altura, número de hojas y grosor del tallo.

Sin embargo, las pruebas de laboratorio con los microorganismos seleccionados fueron positivas en la producción de auxinas (AIA) y enzimas como fosfatasas corroborando los resultados de (Beltrán, 2014) (22) quien reconoce a los géneros de *Enterobacter*, *Serratia* y *Pantoea* como principales géneros bacterianos solubilizadores de fosfato.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio muestran que el aislamiento de rizobacterias solubilizadoras de fósforo de suelos áridos, erosionados y/o afectados por la agricultura es igual de útil como el aislamiento de suelo en Bosques Altos andinos.

La variedad morfológica predominante fenotípicamente entre las rizobacterias solubilizadoras de fosfato con capacidad PGPR fue de bacilos Gram negativos para los dos muestreos trabajados independiente de la clase de suelo ya sea de tipo fértil o deteriorado.

La cantidad de AIA producido por las 18 cepas trabajadas es un factor importante para la promoción de crecimiento, la producción de la fitohormona en las 5 cepas (RBSF 21, RBSF 23, RBSF 36, RBSF 40 y RBSF 46) más activas cuentan con un valor entre 16 a 18 μ l/g rango dentro del cual se ubicaron las cepas RBSF 23 y RBSF 46 presuntivamente identificadas ambas como *Enterobacter cloacae*.

Rizobacterias de los géneros *Enterobacter cloacae* y *Pantoea agglomerans* son capaces de producir altas (18 μ l/g) concentraciones de AIA con un IS >17%, reconociendo actualmente su capacidad PGPRs frente a especies de plantas forestales como *Escallonia paniculata* y *Vallea stipularis*.

Plantas forestales como *Escallonia paniculata* y *Vallea stipularis* son arbustos que en conjunto con inóculos bacterianos con capacidad PGPRs, son capaces de ser utilizados posteriormente en la restauración ecológica de corredores ecológicos y suelos afectados por la erosión e intervención humana.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda que para la evaluación productora de enzimas PGPR las cepas puras sean reactivadas previamente a las 24h antes de su valoración.

Se sugiere la implementación de una prueba cuantitativa como la determinación de la concentración de fosfato solubilizado en partes por millón (ppm) para garantizar una verdadera solubilización de fósforo por parte del microorganismo.

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*) usadas en restauración.

Realizar pruebas de toxicidad en las plantas teniendo en cuenta que los microorganismos aislados son Gram negativos y podrían generar alguna afección a las mismas.

Identificar mediante técnicas moleculares las rizobacterias que presentaron mayor promoción del crecimiento en las plantas.

Realizar pruebas de inoculación con grupos de plantas de diferentes edades para determinar cuál es la etapa de crecimiento de los árboles más adecuada.

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 para poder determinar si los microorganismos poseen características de PGPR.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gálvez J. Restauración Ecológica: Conceptos Y Aplicaciones. Univ Rafael Landívar Fac Ciencias Ambiente y Agrícolas Inst Agric Recur Nat Y Ambient [Internet]. 2002. [citado el 20 octubre de 2015]; 1(8):1–23. Disponible en:
<http://biblio3.url.edu.gt/IARNA/SERIETECNINCA/8.pdf>
2. Barrera-Cataño JI, Valdés-López C. Herramientas para abordar la restauración ecológica de áreas disturbadas en Colombia. Univ Sci [Internet]. 2007. [citado el 20 octubre de 2015]; 12:11–24. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49912203>
3. Vargas O. Estrategias para la restauración ecológica del bosque alto andino [Internet]. 2007. [citado el 28 octubre de 2015]. 271. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/259482680_Estrategias_para_la_restauracion_ecologica_del_bosque_altoandino_El_caso_de_la_Reserva_Forestal_Municipal_de_Cogua_Cundinamarca
4. Fernández I, Morales N, Olivares L, Salvatierra J, Gómez M, Montenegro G. Restauración ecológica para ecosistemas nativos afectados por incendios forestales [internet]. 2010. [citado el 06 noviembre de 2015]; 149. Disponible en:
http://www.conaf.cl/wp-content/files_mf/1363716217res_baja.pdf
5. Murcia C, Guariguata M. La Restauración Ecológica en Colombia: Estado actual, tendencias, necesidades y oportunidades [Internet]. Center for International Forestry Research CIFOR). 2014 [citado el 10 de noviembre de 2015]; 100. Disponible

en: http://www.cifor.org/publications/pdf_files/occpapers/OP-107.pdf

6. Jos S. *Revista de Biología Tropical*. 2015; 1936 (September 1999):1–8.

7. Galindo T, Betancur J, Cadena M. Estructura y composición florística de cuatro bosques andinos del Santuario de Flora y Fauna Guanenta-Alto Río Fonce, Cordillera Oriental colombiana. *Caldasia* [Internet]. 2003; 25 (2):313–35. Disponible en: <http://kdb.kew.org/kdb/detailedresult.do?id=366224>

8. Avella A, Torres S, Gómez W PM. Los páramos y bosques altoandinos del pantano de Monquentiva o pantano de Martos (Guatavita, Cundinamarca, Colombia): caracterización ecológica y estado de conservación. *Red Rev Científicas América Lat el Caribe, España y Port Biota Colomb* [Internet]. 2014 [citado el 10 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/491/49140739002.pdf>

9. 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/sci-hub.cc/doi/10.1111/j.1365-2672.1976.tb04161.x/pdf>

10. 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/sci-hub.cc/nbt/journal/v6/n3/full/nbt0388-282.html>

11. Lemanceau P. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie* [Internet]. 1992[citado el 13 de junio de 2016]; 12 (6):413–37. Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885487/document>.

12. Fernández L, Zalba P, Gómez M, Sagardoy M. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc del Suelo* [Internet]. 2005. [citado el 13 de junio de 2016]; 23(1):31–7. Disponible en: http://suelos.org.ar/publicaciones/vol_23n1/fernandez_31-37.pdf.

13. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* [Internet]. 1999. [citado el 13 de junio de 2016]; 17(4-5):319–39. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975099000142>.

14. Molina-romero D, Morales-garcía YE, Molina-romero D, Bustillos-cristales MR, Rodríguez-andrade O, Elizabeth Y. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Rev la DES Ciencias Biológico Agropecu Univ Michoacana San Nicolás Hidalgo* [Internet]. 2015;17 (2):24–34. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/293086504_Mecanismos_de_fitoestimulacion_por_rizobacterias_aislamientos_en_America_y_potencial_biotecnologico.

15. Prato, Vanessa Paola; Cañón, Ronal Fernando; Alterio Sabino, María Alessandra; Cárdenas Caro DM. Efecto del uso del suelo sobre rizobacterias fosfato solubilizadoras y diazotróficas en el distrito de riego del río Zulia, Norte de Santander (Colombia). *Fund Dialnet* [Internet]. 2009;2(2). Disponible en: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:p8JrtrHpZQgJ:https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5461219.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=co>

16. Hospital de Usme. Localidad Usme diagnóstico local de salud con participación social diciembre. 2011; Disponible en:
http://www.institutodeestudiosurbanos.info/dmdocuments/cendocieu/coleccion_digital/Localidades/Usme/Diagnostico_Salud_Participacion_Usme-Hospital_Usme-2011.pdf.

17. Flora D, Río FG. Estructura y composición florística de cuatro bosques andinos del santuario de flora y fauna guanentá-alto río fonce , cordillera oriental colombiana. Structure and floristic composition of four Andean forests from. 2003; 25(2):313–35.

18. Crespo J, Jaime R. Trabajo de Grado Evaluación del crecimiento de *Bacharis spp.* en dos tipos de suelo inducido por un consorcio de microorganismos comerciales en invernadero para su uso en restauración ecológica. Carrera de Ingeniería Ambiental. Universidad El bosque – Universidad Antonio Nariño. Junio 2017.

19. 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).

20. 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)

21. Reyes I, Alvarez L, El-Ayoubi H, VA. Selección y evaluación de

rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Univ Centroccidental Lisandro Alvarado Venezuela Bioagro [Internet]. 2008 [citado el 16 de junio de 2016]; 20(1) (37-48). Disponible en: [//www.redalyc.org/pdf/857/85720105.pdf](http://www.redalyc.org/pdf/857/85720105.pdf)

22. 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

23. Corrales Ramírez LC, Arévalo Galvez ZY, Moreno Burbano VE. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. Nova [internet]. 2014 [citado el 21 de junio de 2016]; 12(21):67–79. Disponible en: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/251/502>

24. Vargas Ramírez SJ. Microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos. Univ Ind Santander Fac Ciencias [internet]. 2012. [citado el 21 de junio de 2016]; 69. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/7012/2/145102.pdf>

25. Restrepo-Franco GM, Marulanda-Moreno S, de la Fe-Pérez Y, et al. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Rev CENIC Ciencias Biol [Internet]. 2015. [citado el 24 de junio de 2016]; 46(1):63–76. Disponible en: <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=108658147&lang=es&site=eds-live>

26. Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D. Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review. Terra Latinoam [internet].

2009[citado el 24 de junio de 2016]; 28:61–70. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/573/57316076007.pdf>

27. Fernández, M, Rodríguez H. El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [internet] 2005. [citado en 21 junio de 2016] Disponible en:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120688005>

28.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.

27).29. Mik F, Edith D, Su C. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas Screening for isolation and characterisation of microorganisms and enzymes with usefull potential for degradation of cellulose and hemicellulose. 2004;(49):58–71.

25)30.Instituto de Biotecnología. Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias, hongos y levaduras [Internet]. 2000 [citado el 21 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/lineasGrupos/GruposTransversales/doc/lineamientos.pdf>

31. Parra S, Pérez M, Bernal M, Suárez Z, Montoya D. 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). Nov - Publicación Científica. 2006; 4(5):39–49.

32. Habte M, Osorio. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbuscular

mycorrhizal inoculum. University of Hawaii, Honolulu, 2001. 47 p.

33.guia

34. Chung H,*et al.* Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil. Biol. Biochem.* 2005 37:1970–1974.

35. Cárdenas Dsb, Hernandez Adpl. “Comparación de dos Métodos De Conservación, Liofilización y Microsecado Sobre Tres Especies Bacterianas”: Elección Del Mejor Método. 2009;1–35.

36. 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.

37. Díaz M. 2004. Manual de procedimientos banco de cepas y genes. Bacteriología y Laboratorio Clínico. Colombia, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, 50 p.

38. Rivieros, J.A. 2008. Evaluación de microorganismos con potencial en biofertilización para un cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en etapas de semillero y vivero. Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Página 11 – 12

39. Bobadilla C, Rincón S. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfatos

solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. *Microbiologo Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Página 16.

40. Hernández T, Carrión G, Heredia G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45(8), 881-892.

Recuperado en 21 de septiembre de 2017, de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800003&lng=es&tlng=es

41. Osorio N, Habte M. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res. Mgmt.* 15: 263–274. doi:10. 1080/15324980152119810.

42. Seshachala Usha, Tallapragada, Padmavathi. Phosphate Solubilizers from the Rhizosphere of *Piper nigrum* L. in Karnataka, India. *Chil jour of agri rese*, 2012; 72(3), 397-403. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000300014>

43. Seshadri S., Muthukumarasamy R., Lakshminarasimhan C, Ignacimuthu S. 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science*. 79 (5): 565-567.

44. Peris F. Viveros Forestales Para Producción De Planta A Pie De Repoblación. 2010;6.

45. Ángulo V, Sanfuentes E, Rodríguez F, Sossa Ke. *Rev argentina* Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento. 2014;46(4):338–47.

46. Plata UN de la Clase Magnoliopsida [Internet]. 2010. p. 1–19. Disponible en:

http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/botanica_sistematica2/Guia_Magno.pdf

47. Mahecha G, Ovalle A, Camelo D, Rozo A. BD. Catálogo de la Biodiversidad de Colombia [Internet]. Vegetación del territorio CAR. 2008. Disponible en:

<http://catalogo.biodiversidad.co/fichas/3596>

48. Vargas Flores T. Morfología Bacteriana. Rev Actual Clínica [Internet]. 2014 [citado el 16 de Febrero de 2017];49(1):2594–8. Disponible en:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a02.pdf

49. El CARE Bolivia y Cambio, Programa Nacional de Climático. Fichas botánicas de especies agroforestales nativas aptas para tierras altoandinas [Internet]. 2011. p. 1–59. Disponible en: [http://www.ecosaf.org/altiplano/Fichas botánicas CARE.pdf](http://www.ecosaf.org/altiplano/Fichas_botánicas_CARE.pdf)

50. D B. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Edición: 9. Williams LW, editor. Baltimore, USA; 1957. 816 p

51. Herbario JBB. en línea - Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Disponible en: <http://colecciones.jbb.gov.co/herbario>. Consultado en 2018-05-14.

52. OpEPA O. Tíbar - Escallonia paniculata [Internet]. Sites.google.com. [cited 15 May 2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/nogales.edu.co/plants-in-colegio-los-nogales/home/tibar>

53. García, P. Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas. Rev del Inst Investig Trop. 2010;5(13):63–76.

54. Laura Osorno NW. Evaluación de factores que afectan la bioacidulación de

roca fosfórica bajo condiciones in vitro. Rev Colomb Biotecnol [Internet].

2017;XIX(1):53–62. Disponible en:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/65968/pdf>

55. 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)

56. Walterson AM, Stavrinides 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>

57. Solorza-bejarano J. Restauración ecológica de ecosistemas de montaña.. Rev Colomb For [Internet]. 2018;21(1):5–17. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v21n1/0120-0739-cofo-21-01-00005.pdf>

58. Daniel Benjumeda Muñoz EPD. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones [Internet]. Universidad de Sevilla; 2017. Disponible en:

[https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA MU%C3%91OZ%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MU%C3%91OZ%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

59. Rodríguez-ramírez N, Vargas O. Especies leñosas nativas claves para la restauración ecológica del Embalse de Chisacá, basados en rasgos importantes de su historia de vida. Res Gate. 2017;(August). Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/318543306_Especies_lenosas_nativas_claves_para_la_restauracion_ecologica_del_Embalse_de_Chisaca_basados_en_rasgos_importantes_de_su_historia_de_vida

60. Melo-cruz O, Rodríguez-santos N. Patrones de arquitectura foliar asociados al crecimiento funcional restauración ecológica en la Sabana de Bogotá. Colomb For [Internet]. 2012;15(1):119–30. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v15n1/v15n1a04.pdf>

61. Masabni J , Anciso J, RW. ¿Qué hace que las hojas del tomate se doblen o enrollen? [Internet]. 2013. p. 1–6. Disponible en: <https://aggie-horticulture.tamu.edu/vegetable/files/2013/09/EHT-064S-what-makes-tomato-leaves-twist-or-curl.pdf>

62. Vega Celedón P, Canchignia Martínez H, González Myriam, Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. cultrop [Internet]. 2016;37:20. Disponible en : http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362016000500005