

**AI SLAMI ENTO Y CARACTERIZACION DE *Bacillus spp* COMO
FIJADORES BIOL OGICOS DE NITROGENO Y
SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS EN DOS MUESTRAS DE
BIOFERTILIZANTES COMERCIALES**



JEANNY PAOLA CUERVO LOZADA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA
BOGOTA D.C
2010**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *Bacillus spp* COMO
 FIJADORES BIOLÓGICOS DE NITROGENO Y
 SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS EN DOS MUESTRAS DE
 BIOFERTILIZANTES COMERCIALES**



TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de
Microbiólogo Agrícola y Veterinario

Director de Trabajo de Grado
HERNANDO ALFONSO VALENCIA ZAPATA
Profesor Asociado del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá D.C.

MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA
BOGOTA D.C

2010

**AI SLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE Bacillus spp COMO
FIJADORES BIOLÓGICOS DE NITROGENO Y SOLUBILIZADORES DE
FOSFATOS EN DOS MUESTRAS DE BIOFERTILIZANTES COMERCIALES**

JEANNY PAOLA CUERVO LOZADA

APROBADO

**Hernando Alfonso Valencia Zapata
Director Trabajo de Grado**

**Gerardo Moreno
Jurado**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *Bacillus spp* COMO
FIJADORES BIOLÓGICOS DE NITRÓGENO Y SOLUBILIZADORES DE
FOSFATOS EN DOS BIOFERTILIZANTES COMERCIALES**

JEANNY PAOLA CUERVO LOZADA

APROBADO

INGRID SCHULER., Ph.D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Bact.M.SC., M Ed JANET ARIAS
Directora
Carrera de Microbiologías

AGRADECIMIENTOS

A DIOS QUIEN FUE MI GUIA CONSTANTE: AL PROFESOR HERNANDO VALENCIA POR SU CONFIANZA, COLABORACION, PACIENCIA Y AYUDA, A MI HIJO TOMAS, A MI PAPA, MI FAMILIA Y A TODAS LAS PERSONAS QUE HICIERON POSIBLE ALCANZAR ESTE LOGRO TAN IMPORTANTE EN MI VIDA.

JEANNY PAOLA CUERVO LOZADA

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara para que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

ARTICULO 23 RESOLUCION NÚMERO 13 DE JULIO DE 1946

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. MARCOTEORICO	3
3.1 Fijación biológica de Nitrógeno	4
3.1.1 Generalidades	4
3.1.2 La fijación asociativa de nitrógeno	5
3.1.3 Microorganismos fijadores biológicos de nitrógeno	5
3.2 Solubilización de fosfatos	5
3.2.1 Microorganismos solubilizadores de fosfato	6
3.3 El género <i>Bacillus</i>	7
3.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	8
3.3.2 <i>Bacillus sphaericus</i>	8
3.3.3 <i>Bacillus firmus</i>	9
4. OBJETIVOS	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivo específicos	10
5. FICHA TECNICA DE LOS PRODUCTOS	11
5.1 KODIAK	11
5.1.2 MBE (Microorganismos biológicos efectivos)	12
6. METODOLOGIA	12
6.1.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos	13
6.1.2 Descripción macroscópica	13
6.1.3 Descripción microscópica	13
6.2 Caracterización Bioquímica	13
6.3 Aislamiento y caracterización de cepas solubilizadoras de fosfato inorgánico	13
6.4 Aislamiento y caracterización de cepas Fijadoras biológicas de Nitrógeno	14
7. RESULTADOS Y DISCUSION	14
7.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos	15
7.2 KODIAK	15
7.3 Microorganismos biológicos efectivos (MBE)	15
7.3.1 Características macroscópicas de C2	15
7.3.2 Características microscópicas de C2	16
7.3.3 Características macroscópicas de C3	16
7.3.4 Características microscópicas C3	16
8. Caracterización bioquímica Cepa K1 KODIAK	17
8.1.1 Caracterización bioquímica de Microorganismos biológicos efectivos (MBE)	18
8.1.2 Características y pruebas bioquímicas de C3	19
8.2 Aislamiento y caracterización de cepas solubilizadoras de fosfato inorgánico	20
8.3 Aislamiento y caracterización de cepas fijadoras de Nitrógeno	22
9. CONCLUSIONES	24
10. RECOMENDACIONES	25
11. BIBLIOGRAFIA	26
12. ANEXOS	28

1. INTRODUCCIÓN

La producción de biofertilizantes en el mundo nació a finales del siglo XIX bajo los estudios de Winogradsky, Waksman y Lipman, pioneros de la microbiología del suelo, al investigar en los microorganismos su capacidad metabólica para degradar nutrientes, considerándolos importantes en la fertilización del suelo. El suelo agrícola cultivado en el mundo, ha sido degradado por el mal manejo de las prácticas agropecuarias. Colombia vivencia esta problemática que afecta a la comunidad agrícola mundial, por lo que es necesario establecer investigaciones que desarrollen un conocimiento paralelo a la preservación de los ecosistemas con el uso de biofertilizantes que han tomado un papel importante y se han realizado actividades investigativas y desarrollos a nivel empresarial, donde se incluyen las metodologías de muestreo, aislamiento, selección y caracterización de microorganismos con funciones biológicas específicas, con el fin de generar productos comerciales, los cuales también cuentan con pruebas de eficacia y estabilidad utilizadas con el objetivo de reducir costos, intensificar las interacciones biológicas y benéficas de los procesos naturales, proteger la salud y medio ambiente. Esta propuesta hace parte de un proyecto de investigación en el área de Microbiología del Suelo con énfasis en ecología microbiana del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia en el cual se realizan análisis en el control de calidad de biofertilizantes.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia de los biofertilizantes radica en que son una opción amigable para el suelo ya que debido al uso excesivo de las tierras de cultivo, estas puedan presentar un desgaste, por lo tanto se espera contribuir a mitigar el problema de contaminación ambiental provocado por el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, mediante el uso de los biofertilizantes. En este trabajo se analizaron dos biofertilizantes; uno de producción artesanal en medio líquido y el otro en medio sólido en polvo; en uno de los productos se especifica que contiene un cultivo microbiano y el otro un *Bacillus* sp. Con base en lo anterior se determinara si contienen microorganismos pertenecientes a los grupos funcionales: fijadores biológicos de Nitrógeno o solubilizadores de fosfatos, los cuales pueden ejercer gran impacto agronómico. Así resulta de interés verificar su presencia e identificación y constatar su viabilidad después de cuatro años de almacenamiento en condiciones ambientales de Bogotá.

3. MARCO TEORICO

Los biofertilizantes son insumos biológicos de bajo costo que sustituyen total o parcialmente a los fertilizantes sintéticos. El instituto Colombiano Agropecuario ICA (Resolución 00375 del 27 de febrero de 2004) define un inoculante biológico como un producto elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que al aplicarse al suelo o las semillas promueven el crecimiento vegetal o favorecen el aprovechamiento de los nutrientes, en asociación con la planta o su rizosfera. Incluye entre los productos elaborados con micorrizas, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y los géneros *Rhizobium* sp, *Frankia* sp, *Beijerinckia* sp y bacterias fosfato solubilizadoras (ICA, 2004).

Autores como (Vassilev *et al.*, 2001) consideran que un inoculante biológico es una preparación de microorganismos que pueden sustituir parcia o totalmente la fertilización química. (Roveda *et al.*, 2007).

Los biofertilizantes se pueden aplicar en suelos degradados y donde la presencia de microorganismos han sido afectada negativamente por el uso inapropiado de técnicas agrícolas (exceso de agroquímicos, talas, quemas, entre otras) que han propiciado la degradación y han reducido su diversidad y efectividad. Además, se debe inocular cuando existen poblaciones altas de microorganismos que no se asocien efectivamente con la especie de la planta cultivada.

En términos generales, los inoculantes se deben aplicar en suelos que presenten deficiencia del nutriente específico, cuando existen (bajas o altas) de microorganismos que tengan baja capacidad de colonización y/o baja eficiencia como inoculantes, o suelos donde existan cepas nativas del microorganismo o que sus poblaciones se hayan visto seriamente reducidas por procesos de degradación de suelos. (Pankurts *et al.*, 1997).

En los últimos años en Colombia se ha estudiado y evaluado la acción biofertilizante con microorganismos que participan en la fijación de nitrógeno (simbiótica y asimbiótica), hongos formadores de micorrizas arbusculares que contribuyen con la absorción de nutrientes y agua, y bacterias capaces de solubilizar el fosforo presente en el suelo. De igual forma, se han realizado investigaciones empleando la doble inoculación de micorrizas

arbusculares y cepas de *Rhizobium* asociadas con plantas de arveja. (Roveda *et al.*, 2007).

ICA-CORPOICA tienen una gran experiencia en biofertilizantes como *Rhizobium* sp desde 1985, micorrizas desde 1994, *Azotobacter* sp, 2000 y recientemente con bacterias solubilizadoras de fosfato en el 2005.

Se ha observado los éxitos alcanzados en algunos países tropicales Brasil, Cuba, Perú, India, Filipinas entre otros con la utilización de los biofertilizantes, ha permitido su extensa aplicación en diferentes cultivos de interés como la caña de azúcar, trigo, arroz, tomate, algodón entre otros con la reducción hasta del 50% de los fertilizantes nitrogenados y fosfóricos convencionales con un incremento en los rendimientos entre el 15-30%. (Peñaranda *et al.*, 2005).

De la calidad y uso adecuado del biofertilizante depende la sostenibilidad de los agroecosistemas, acompañados de otras prácticas sostenibles de manejo agrícola, como son la rotación y sucesión de cultivos, la siembra de policultivos, el control biológico de plagas y enfermedades, la producción orgánica, los sistemas de cultivo y preparación del suelo entre otros. (Valero, 2003).

3.1 Fijación biológica de Nitrógeno

3.1.1 Generalidades

La fijación de nitrógeno puede ser puramente abiótica o biológica. En la primera se forman óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos, descargas eléctricas que son arrastrados al suelo por la lluvia o amonio por el proceso industrial Haber Bosch; en tanto la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso llevado a cabo por organismos procariontes en el N_2 es reducido a amonio e incorporado a la biosfera.

A pesar de la abundancia de este elemento en la atmósfera más del 70%, no es aprovechable por las plantas, las cuales se ven obligadas a utilizar las formas combinadas que se encuentran en el suelo en cantidad insuficiente para soportar los cultivos intensivos. Por lo que supone en el aporte de nitrógeno a la planta, la FBN ha despertado gran interés lo que ha considerado objeto de intensa investigación desde su descubrimiento en 1888. Con excepción del agua, el

nitrógeno generalmente es considerado el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural (Bowen *et al.*, 1994).

Hoy en día cobra más valor, dentro de contexto de la agricultura sostenible, ya que se puede evitar el uso exagerado de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio. (Arévalo, 2003).

3.1.2 La fijación asociativa de nitrógeno

Hay muchas investigaciones en las cuales se ha comprobado otra forma de relación, diferente a la simbiosis, entre fijadores de nitrógeno y plantas, esta es debida a diazotrofos de vida libre y asociados a raíces. Este tipo de asociación que usualmente no exhibe modificaciones o cambios morfológicos de la planta o hospedero o interacciones genéticas específicas entre la planta y la bacteria tales como se observan en los nódulos de las raíces de las leguminosas. Las bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno que viven en la rizosfera y sobre la superficie de las raíces utilizan los exudados, secreciones como recurso de carbono para obtener energía utilizable para su crecimiento y fijación de nitrógeno, además algunas bacterias pueden ocupar internos de las plantas (endófitas), crecer y llevar a cabo allí su actividad.

3.1.3 Microorganismos fijadores biológicos de nitrógeno (diazotróficos)

Los microorganismos capaces de catalizar el rompimiento del triple enlace de nitrógeno y activarlo para que se combine con otros elementos químicos, como el hidrogeno o el oxigeno, se les conoce con el nombre de fijadores de nitrógeno o diazotrofos (Mishustin *et al.*, 1971).

Dentro de las bacterias de vida libre encontramos especies de *Azospirillum*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*. Numerosas investigaciones en el ámbito mundial demuestran las bondades la utilización de bacterias asimbióticas del género *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. En lo que se refiere a la reducción del periodo de tiempo de germinación en las semillas de tomate, ají y algodón, inoculadas con este microorganismo probablemente por la inducción de la producción de hormonas de

crecimiento, incrementan la respuesta a la fertilización química u orgánica.

3.2 Solubilización de Fosfatos

El fósforo se encuentra en el suelo de manera orgánica e inorgánica y continuamente se va transformando, las formas inorgánicas del fósforo son pH dependientes, mientras que el fósforo orgánico depende de otros factores como el clima la vegetación, la textura del suelo, prácticas de manejo e irrigación.

La disponibilidad del fósforo está controlada por la mineralización e inmovilización a través de la fracción orgánica, la solubilización y precipitación de fosfato a formas orgánicas. La mineralización es un proceso enzimático, en donde el grupo de enzimas fosfatas catalizan una variedad de reacciones que liberan fosfatos de compuestos orgánicos hacia la solución del suelo, estas fosfatasas son liberadas por microorganismos extracelularmente. A partir de este momento pueden ser tomadas por las plantas, inmovilizado en las células microbianas o puede formar complejos inorgánicos insolubles (Osorio, 2000).

3.2.1 Microorganismos solubilizadores de fosfato

La actividad microbiana es de gran trascendencia, al solubilizar los fosfatos no disponibles para la planta, los cuales se encuentran bajo formas orgánicas e inorgánicas. La habilidad para solubilizar los fosfatos se encuentra presentes en abundantes microorganismos como bacterias, levaduras, actinomicetes y hongos de vida libre que han sido relacionados con el incremento en la disponibilidad de fósforo en el suelo. A través de la aplicación de los biofertilizantes a base de microorganismos solubilizadores de fosfatos, la disponibilidad de fósforo puede incrementarse y el producto de su acción (fosfatos soluble) puede ser absorbido eficientemente por las plantas. (Rodríguez, 2002).

Entre los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad para solubilizar fosfatos se encuentran: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Azotobacter* y *Erwinia* observando una cantidad considerablemente mayor en la rizosfera, en comparación con el suelo no rizosférico (Rodríguez *et al.*, 1999). Igualmente, se ha documentado la actividad fosfato solubilizadora por diferentes hongos

saprotitos del suelo tales como *Aspergillus niger*, *Penicillium bilaii*, *P. simplicissimum*, *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium herbarum* y hongos micorrizos, principalmente del género *Glomus* (Cunnimgham y Kuiak 1992, Dixon-Hardy *et al.*, 1998).

3.3 El género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos periticos. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos. (Koneman, 2001).

Taxonómicamente según la segunda Edición del Manual Bergey's (1982). El género *Bacillus* pertenece a la familia I *Bacillaceae*, del orden I *Bacillales* de clase tres *Bacilli*, del *fillum* BXIII *firmicutes* del Dominio bacteria. En la primera edición del género es claramente diverso desde el punto de vista fenotípico y genotípico. La diferenciación entre especies del género *Bacillus* se centro en los resultados en la fermentación de lactosa, sorbitol, manitol, melobiosis, hidrólisis de la urea, y descarboxilacion de la lisina. (Anderson *et al.*, 2003).

Más recientemente, los datos de la secuencias de RNA se han empleado para dividir géneros de *Bacillus* en al menos cinco líneas diferentes. Entre las especies más representativas del género *Bacillus* se encuentran *B. alkalophilus*, *B anthracis*, *B azotoformans*, *B brevis*, *B cereus*, *B subtilis*, *B coagulans*, *B firmus*, *B insolitus*, *B lincheniformis*, *B polimyxa* y *B turingiensis* entre otros. (Berge'ys ,2000) (Bergey´s ,1984).

3.3.1 *Bacillus subtilis*

División: Firmicutes

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus subtilis*

Es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termorresistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación la radiación los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón, vive dentro de los límites de 55 a 70°C. Es un gran controlador biológico, *Bacillus subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfii*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp, y el nematodo nodulador de raíces (*Meloidogyne* spp) y *Rhizoctonia solani*, agente causal de la enfermedad denominada "mal del tallito" del algodónero. (Calderón *et al*, .2002).

3.3.2 *Bacillus sphaericus*

División: Firmicutes

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus sphaericus*

Bacilo Gram positivo, aerobio estricto incapaz de utilizar azúcares para su crecimiento, en Agar Nutritivo crece en diferentes formas compactas difundiéndose en el medio. Algunas especies producen colonias rosa, se aísla a partir de sedimentos de río, sedimento marino, y algunos alimentos. Algunas cepas son reconocidas por su patogenicidad contra larvas y mosquitos. (Berge's, 2000) (Berge's, 1984). Presenta variedad de inclusiones las cuales son cuerpos elípticos que no cambian en apariencia en el paso del intestino a la larva. Los mosquitos ingieren las bacterias y la toxina altera el funcionamiento del intestino del mosquito, Es bicontrolador de larvas de *Anopheles Pseudopunctipennis* y *Culex Quinquenotatus*. (Balows, 1988).

Este organismo es utilizado como insecticida biológico y es efectiva de una a cuatro semanas después de la aplicación. Es utilizado como patrón de las macromoléculas biológicas tales como enzimas,

proteínas de los receptores o ácidos nucleídos y estabilización térmica de los lípidos basados en estructuras, como la membrana.

3.3.3 *Bacillus firmus*

División: Firmicutes

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus firmus*

Bacteria Gram positiva, su endospora es en forma elipsoidal, *Bacillus firmus* es considerada una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) fosfato solubilizadora ya que aumenta la disponibilidad de fósforo para las plantas. Se ha reportado como bacteria componente de la rizosfera del roble (*Quercus* sp) que junto con otras especies *B. brevis* y de *Streptomyces* mejoran la sanidad del árbol y estimulan el crecimiento de la raíz de canola (Mohammad *et al.*, 1993; Peterman *et al.*, 2001). *Bacillus firmus* es también utilizado como controlador biológico de *Phytophthora capsici* en Jitomate (Lagunas *et al.*, 2001).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ❖ Aislamiento y caracterización de especies de *Bacillus* como fijadores biológicos de nitrógeno o solubilizadores de fosfatos en dos biofertilizantes comerciales.

4.2 Objetivo específicos

- ❖ Determinar la composición biológica del inoculante microbiano presente en el biofertilizante MBE
- ❖ Comprobar la viabilidad del inoculante microbiano después de cuatro años de almacenamiento, en condiciones ambientales de Bogotá, usados en los biofertilizantes KODIAK y MBE.
- ❖ Evaluar la presencia de microorganismos solubilizadores de fosfato inorgánico
- ❖ Evaluar cualitativamente la actividad de disolución (solubilización) de fosfatos minerales (fosfato tricálcico) con base a la formación de halo de solubilización en medio de cultivo sólido.
- ❖ Evaluar la presencia de microorganismos Fijadores biológicos de nitrógeno de vida libre.

5. FICHA TECNICA DE LOS PRODUCTOS

5.1 KODIAK



Figura 1. Presentación del proctoducto KODIAK

KODIAK es un biofertilizante que contiene una selecta cepa de *Bacillus subtilis* que inicialmente fue aislado de las plantas de algodón. Subsecuentemente pruebas han demostrado su capacidad para proteger las raíces de muchas especies de plantas.

KODIAK es un agente microbial que protege las plantas enfermas mediante mecanismo competencia por espacio, sustrato y antibiosis. Colonizando las raíces y creciendo a medida que las plantas se desarrollan y proporcionando mayor protección de la raíz atacando las enfermedades causadas por *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus* y así mejora la nodulación por *Rhizobium*.

KODIAK está diseñado para proteger la semilla durante la germinación y el desarrollo temprano de la raíz y una vez que la radícula emerge las posibilidades de pérdidas totales de la planta se reducen considerablemente. Estudios realizados a nivel mundial confirman el efecto de *Bacillus subtilis* como agente inductor de resistencia sistematica, reduciendo significativamente el ataque de las enfermedades.

5.1.2 MBE (Microorganismos biológicos efectivos)



Figura 2. Presentación del producto MBE

El biofertilizante EMB es un producto artesanal que fue creado en el año 2008 por empresarios de Medellín; donde se encuentra un consorcio de microorganismos benéficos presentes en la naturaleza que pueden ser aplicados como inoculantes para mejorar la diversidad microbiana y vegetal, además es un producto que puede ser utilizado en procesos de compostaje y en el manejo de residuos orgánicos, también puede aumentar la vida útil de los pozos sépticos, descomponer residuos de podas y jardinería, para el tratamiento de estiércoles y establos.

La base tecnológica del EMB es una mezcla de diferentes tipos de microorganismos todos ellos benéficos para el mejoramiento de los suelos que poseen propiedades de fermentación, producción de sustancias bioactivas, competencia y antagonismo con patógenos, todo lo cual ayuda a mantener un equilibrio natural entre los microorganismos que conviven en el entorno, trayendo efectos positivos sobre la salud y bienestar del ecosistema. Composición: Agua, Melaza orgánica, sacarina, fructosa, dextrosa y cultivos microbianos su vida útil es de 120 días.

6. MATERIALES Y METODOS

Los anteriores productos han permanecido almacenados en condiciones ambientales de Bogotá, temperatura promedio 14 °C mas o menos 5 °C y H.R. entre 60% y 72%.

6.1.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos evaluados en los biofertilizantes: KODIAK y Microorganismos Biológicos Efectivos (MBE), se realizó primero cuantificación en medio SPC o Agar placa de conteo estándar, mediante el método de cuantificación de células viables en series de diluciones decimales y siembra en superficie, por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C por 24 a 72 horas (Madigan *et al.*, 1998). Posteriormente se seleccionaron los diferentes tipos de colonias y se sembraron por estriado y agotamiento en agar nutritivo para la obtención de cultivos puros.

6.1.2 Descripción macroscópica

Se describió la morfología de la colonia, tamaño, color, borde acompañada de registros fotográficos.

6.1.3 Descripción microscópica

Se aplicó la coloración de Gram y coloración para endosporas bacterianas (Shaeffer-Foulton), para determinar tipo de pared y la morfología de las células bacterianas, así como el tipo de agregación, mediante observación microscópica a 100x y 1000x.

6.2 Caracterización Bioquímica

A cada cepa se le realizó una caracterización de pruebas fisiológicas y bioquímicas con base criterios expuestos en la literatura (Holt *et al.*, 1984, Patriquin *et al.*, 1983, De Polli *et al.*, 1986, Baldani *et al.*, 1986, Tarr *et al.*, 1979, Dobereiner, *et al.*, 1988). Se seleccionaron las siguientes pruebas: Oxidasa, Catalasa, fermentación de Glucosa Lactosa, Maltosa, Manitol, Arabinosa, Xilosa, Hidrólisis de Caseína, Hidrólisis del almidón, crecimiento en NaCl al 7%, asimilación de Citrato, SIM (H₂S, Indol, Movilidad), Voges-Proskauer, (producción de acetoina o 2,3 butanodiol), reducción de Nitratos, Ureasa, licuefacción de la gelatina, para determinar el género de los microorganismos aislados.

6.3 Aislamiento y caracterización de cepas solubilizadoras de fosfato inorgánico

Para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico se utilizó el medio SRS según Sundara, Rao, Sinha siguiendo el procedimiento desarrollado por (Pramer & Schmidt, 1954). A partir de las colonias aisladas anteriormente se realizó una siembra masiva en el medio SRS que contiene sales de fosfato de calcio y púrpura de bromocresol como indicador de pH. Al cabo de 5 a 8 días a 37°C, se

seleccionaron colonias bacterianas que crecieron acidificando el medio de cultivo y formando un halo transparente alrededor de la colonia, indicando la producción de fosfatos tricálcico o actividad solubilizadora.

6.4 Aislamiento y caracterización de cepas fijadoras biológicas de Nitrógeno

Para el aislamiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno se realizó a partir de las colonias seleccionadas anteriormente y se sembraron por agotamiento en medio NFB, el cual es un medio selectivo carente de Nitrógeno combinado. Según Renie (1988), el medio tiene una fuente combinada de carbono que le permite recuperar mayor cantidad de diferentes microorganismos diazotróficos y donde solo crecen los que poseen el complejo enzimático de la nitrogenasa, (N-asa), que permite reducir el nitrógeno atmosférico y utilizarlo en su metabolismo. Se procedió a la descripción macroscópica de las colonias con el fin de evaluar las características morfológicas en el medio de cultivo sólido. La caracterización microscópica incluyó tinción de Gram. (Madigan *et al.*, 1998).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos

A continuación se presentan los resultados de la cuantificación y caracterización de los aislamientos obtenidos en agar SPC (Standard Plate Count) de las muestras de los dos biofertilizantes en estudio. (Tabla.1).

Tabla 1. Cuantificación de células viables en los biofertilizantes. KODIAK Y MBE en agar placa de conteo

Biofertilizante	Colonias	ufc g⁻¹ o ufc mL⁻¹
KODIAK (polvo seco)	K1	18 x10 ⁵
MBE (líquido)	C1 y C2	29 x10 ⁶

Se aislaron tres tipos de colonias codificadas así: Colonia 1 (K1) y colonias 2 y 3 (C2 y C3) de los productos KODIAK y MBE respectivamente.

7.2 KODIAK

Cepa K1. Macroscópicamente se observaron colonias de 2 a 4 mm de diámetro de formas redondas, lisas, de borde irregular consistencia cremosa en placa en placa de Agar Nutritivo. (Figura.3).

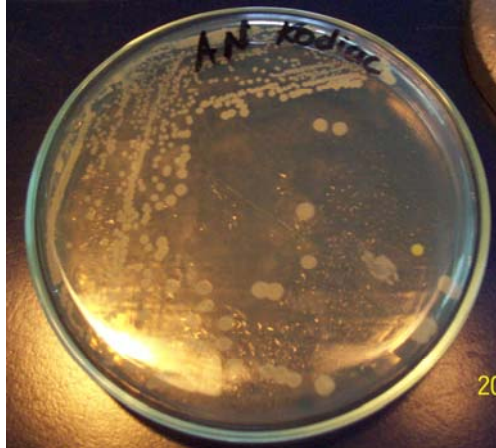


Figura. 3 Colonias de la cepa K1

Microscópicamente: se observan bacilos Gram positivos de 0.8 μm de diámetro por 2 a 3 μm de largo con borde redondeado, esporas esféricas y centrales (Figura 4).

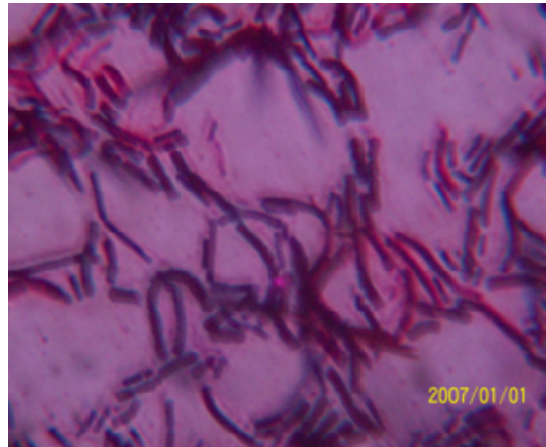


Figura.4 Fotomicrografía de bacterias de K1. Gram positivas. 1000x

7.3 Microorganismos biológicos efectivos (MBE)

Para el biofertilizante MBE en Agar Nutritivo se observaron dos tipos de colonias de apariencia ramificada características de algunas especies pertenecientes al género *Bacillus*.

7.3.1 Macroscópicamente: C2 Colonias de 2 a 4 mm de diámetro, irregulares de consistencia cremosa. Presentan color beige oscuro y con producción de pigmentación rosado claro hacia el centro de la colonia (Figura 5).



Figura. 5 Fotografía de colonias de la cepa C 2

7.3.2 Microscópicamente: C 2 Se observan bacilos Gram positivos, de 1 μm de ancho por 1.5 a 5 μm de largo, se presentaron esporas esféricas que se sitúan en la parte terminal del esporangio y le dan un aspecto de raqueta. (figura. 6)

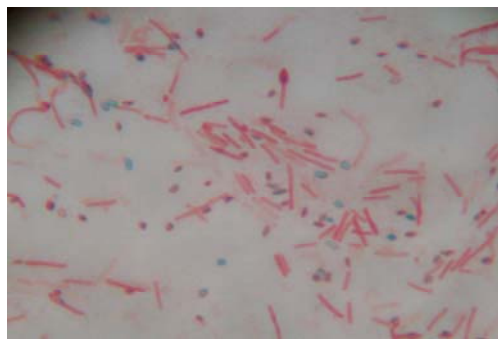


Figura 6. Microfotografía de la cepa C2. 1000X

7.3.3 Macroscópicamente: C3 En Agar Nutritivo se observan Colonias 2 a 4 mm de diámetro de bordes irregulares, de consistencia gomosa. (Figura.7)



Figura 7. Colonias de la cepa C3

7.3.4 Microscopicamente C3: Se observan bacilos Gram positivos de 0.6 a 0.9 μm de diametro por 1.2 a 4 μm de largo en forma de cadena, esporas elipsoidal en posición central.(Figura.8).



Figura 8. Microfotografía de bacilos de la cepa C3. 1000X.

8. Caracterización bioquímica Cepa K1 KODIAK

Tabla 2. Características y pruebas Bioquímicas para la cepa K1

Prueba	Reacción
Reacción a tinción de Gram	+
Crecimiento anaeróbico	-
Posición de la espora	Central
Oxidasa	-
Catalasa	+
Fermentación de la Glucosa	+
L-arabinosa	+
D-xilosa	+
D-Manitol	-
Hidrólisis del almidón	+
Hidrólisis de la caseína	+
Hidrólisis de la Urea	-
Movilidad	+
Utilización del Citrato	+
Reducción de Nitrato	+
Crecimiento en NaCl al 7%	+
Crecimiento a pH 5.7	-
Hidrólisis de la Gelatina	+
Voges- Proskauer	+

En el biofertilizante KODIAC se aisló una cepa que presento tinción de Gram positiva, con endospora central y crecimiento aeróbico, catalasa positiva, presenta hidrólisis del almidón y reduce los nitratos, no produce indol, forma escasa cantidad de ácido sulfúrico, presenta crecimiento en NaCl al 7%, tiene reacción positiva Voges Proskauer, es manitol negativo y utiliza el citrato,(Tabla 2). Por base a los resultados anteriores la cepa K1 corresponde *Bacillus subtilis* (Bergey's, 2000).

Según Gonzales y Fragozo 2002, señalan que la bacteria *Bacillus subtilis* no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilinas y otros antibióticos de la familia iturinas. La subtilina secretada por *Bacillus subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos. Se ha demostrado que induce resistencia sistemática natural de la planta contra el patógeno bacteriano y fungoso propiedad llamada resistencia sistemática Adquirida (SAR). Se utiliza industrialmente como bioinsecticida y

biofungicida. *Bacillus subtilis* se ha utilizado para el control biológico de *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae* y *P. capsici* en suelos infestados por el patógeno en cultivos de frijol y tomate. (Filippov y Kuznetzova ,1994). Investigaciones recientes muestran que *Bacillus subtilis*, no solamente inhibe al patógeno, sino que además, promueve el crecimiento de la raíz y la planta, e incrementan el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol en las hojas del tomate (Nemec *et al.*, 1998). Del mismo modo se ha utilizado en el tratamiento de semillas de cereales, algodón y maíz. En general *Bacillus subtilis* es utilizado como un organismo antagonista en aplicaciones agronómicas.

8.1.1 Caracterización bioquímica de Microorganismos biológicos efectivos (MBE)

Tabla 3. Características y pruebas bioquímicas de la cepa C2

Prueba	Reacción
Reacción a Tinción de Gram	+
Posición de la espora	Central
Crecimiento anaeróbico	-
Catalasa	+
Oxidasa	+
Fermentación de Glucosa	-
L-arabinosa	-
D-xilosa	-
D-Manitol	-
Hidrólisis del almidón	-
Movilidad	-
Hidrólisis de la caseína	d
Utilización del Citrato	-
Reducción de Nitrato	-
Crecimiento en NaCl al 7%	d
Crecimiento a pH 5.7	-
Hidrólisis de la Gelatina	+
Hidrólisis de la Urea	+
Voges- Proskauer	-

d. reacción débil

La cepa C2 presentó tinción de Gram positiva, catalasa positiva, no produce productos neutros (2,3 butanodiol, negativo Voges Proskauer), hidrólisis del almidón negativa, es variable a la reacción de la caseína (negativa o débil) y al crecimiento en NaCl al 7%, hidrolis de la urea, no asimila citrato, no asimila los azúcares proporcionados. Se determino que este microorganismo pertenece a la especie *Bacillus sphaericus* (Bergey´s, 1989; Bergey´s, 2000).

Entre las aplicaciones de cepas de *Bacillus sphaericus*, dada su alta patogenicidad contra algunas larvas de mosquitos, es su efecto larvicidas de insectos (Poinar y Thomas, 1978; Maldigan *et al.*, 2000). Por otra parte, investigaciones sobre el control de los mosquitos hematófagos han tenido gran influencia en el campo de la salud pública, por el importante papel que cumplen en la transmisión de enfermedades al hombre. Se conocen alrededor de 150 especies de mosquitos, de las cuales 43 son del género *Anopheles*. (Calderón *et al.*, 1995). Entre ellos se encuentran los vectores de malaria, y el resto corresponde al grupo de los *Culicíneos* que incluyen los géneros *Culex*, *Aedes*, *Sabethes*, vectores de encefalitis equina, dengue y fiebre amarilla silvestre, respectivamente. Según la OMS (1999), las larvas de mosquitos de los géneros *Psorophora* y *Culex* son muy susceptibles a *Bacillus sphaericus*, seguido por los géneros *Mansonia*, *Anopheles* y *Aedes*, en orden decreciente. Las larvas de *Culex* tienen un nivel de susceptibilidad muy elevado, del mismo orden que su susceptibilidad a los larvicidas químicos de uso corriente. *Bacillus sphaericus* es un buen controlador biológico ha merecido el mayor apoyo y atención en todo el mundo (OMS, 1982) bacterias esporógenas han demostrado ser más específicas en su toxicidad contra organismos blancos que otros insecticidas.

8.1.2 Tabla 4 Características y pruebas bioquímicas de C3

Prueba	Reacción
Reacción a Tinción de Gram	+
Posición de la espora	central
Crecimiento anaeróbico	-
Catalasa	+
Oxidasa	-
Fermentación de la Glucosa	+
L-arabinosa	-
D-xilosa	-
D-Manitol	+
Hidrólisis del almidón	+
Hidrólisis de la Gelatina	+
Movilidad	+
Hidrólisis de la caseína	+
Utilización del Citrato	-
Reducción de Nitrato	d
Crecimiento en NaCl al 7%	+
Crecimiento a pH 5.7	-
Hidrólisis de la Gelatina	+
Voges- Proskauer	-

d. reacción débil

La cepa C3 presento tinción de Gram positiva, endospora en forma elipsoidal, crecimiento aeróbico, utilizo la glucosa y manitol pero no arabinosa ni xilosa, hidrolizaron el almidón y la caseína, crecimiento lento en NaCl al 7%, crecimiento lento en ausencia de oxígeno, especialmente en nitrato, sin reducción del citrato. Por todo lo anterior la cepa en cuestión se determinó taxonómicamente como *Bacillus Firmus* (Bergey´s, 1984; Bergey´s, 2000). (Tabla 4). *Bacillus firmus* pertenece al grupo II, al cual pertenecen también *B. trhurigenesis*, *B subtilis*, *B megaterium* entre otras. Se ha reportado como bacteria componente de la rizosfera del roble (*Quercus* sp), que junto con otras especies *B. brevis* y de *Streptomyces* mejoran la sanidad del árbol y estimulan el crecimiento de la raíz de canola (Mohammad *et al.*, 1993; Peterman *et al.*, 2001)

8.2 Aislamiento y caracterización de cepas solubilizadoras de fosfato inorgánico

De las tres cepas aisladas, K1, C2, C3, en los dos biofertilizantes no se seleccionaron bacterias fosfato solubilizadoras, debido a que no presentaron halos de solubilización y los bacilos aislados no tuvieron la capacidad de acidificar el medio y probablemente no tienen actividad fosfato solubilizadora. (Figura.9). No obstante no se puede afirmar contundentemente que ninguna cepa no presente capacidad solubilizadora de fosfatos inorgánicos, cuando no se realizó la prueba de solubilización en medio líquido, mediante método con espectrofotometría, considerado de mayor validez, comparado con el medio SRS agarizado (Whitelaw, 1999). Al respecto son interesantes los resultados registrados por Roger *et al.*, (1996), quienes encontraron en rizósfera de arroz, una cepa de *B. firmus* solubilizadora de fosfato, además de encontrar una importante actividad como productora de ácido indol acético (AIA). En el presente estudio la cepa de *B. firmus*, si bien no presentó actividad solubilizadora en las placas de SRS si presentó crecimiento en el medio NFb, indicando su potencialidad como microorganismo fijador biológico de N₂, para lo cual naturalmente se recomienda una cuantificación mediante la prueba ARA o ensayo de reducción de acetileno.

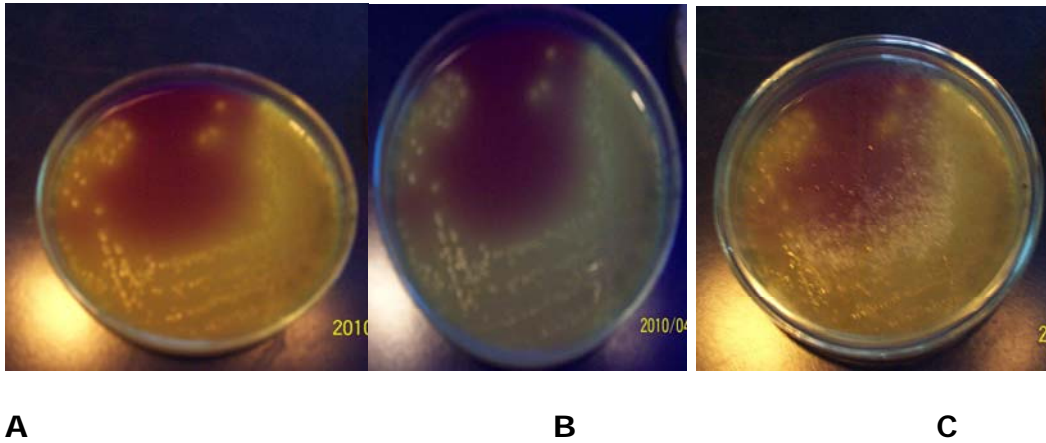


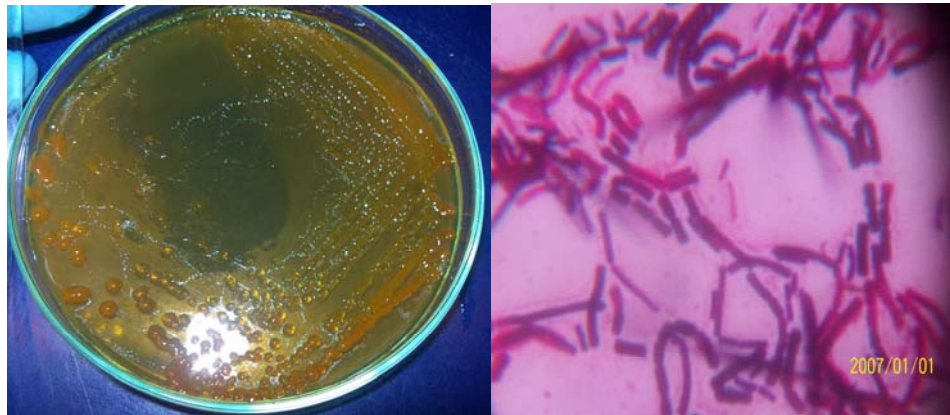
Figura 9. A) Fotografía de colonias de la cepa K1 B). Colonias de la cepa C2. C) Colonias de cepa C3.

Estos resultados se dieron probablemente a que los microorganismos evaluados no tomaron como fuente de fósforo el fosfato tricálcico, el cual actúa como fuente inorgánica de fósforo cuyo mecanismo es la solubilización y producción de ácidos orgánicos generados por la degradación bacteriana de la fuente de carbono. Según Kpombrekou y Tabatabai(1994), la actividad fosfato solubilizadora está determinada por la capacidad bioquímica microbiana de producir ácidos orgánicos que por medio de los grupos carboxílicos quelan cationes unidos a fosfato convirtiéndolos en formas solubles, aunque la producción de ácidos orgánicos es uno de los mayores responsables en este proceso, no es el único mecanismo para solubilizar fosfatos. (Figura.9).

También es importante afirmar que en las condiciones experimentales aplicadas no se puede afirmar que los microorganismos carezcan de capacidad solubilizadora del fosfato tricálcico, pues esta actividad también depende de la fuente de nitrógeno utilizada y puede variar si es de nitrato o de amonio ($N-NO_3$ o $N-NH_4$). En el caso particular se utilizó sulfato de amonio.

8.3 Aislamiento y caracterización de cepas fijadoras de Nitrógeno

Con respecto a los fijadores biológicos de Nitrógeno. La cepa de *Bacillus firmus*, aislada en el medio de NFB contenida en el biofertilizante EMB, presenta capacidad potencial como fijadora biológica de nitrógeno. Se evidenció en el medio NFB colonias redondeadas, translúcidas a transparentes, mucoides -consistencia gomosa. (Figura.10 A). A la cloración de Gram dan reacción Gram positiva, formando bacilos largos, cortos algunos curvos, generalmente dispuestos en cadenas. (Figura.10 B).



A

B

Figura. 10 A) Colonias de *Bacillus firmus* en NFB B) Microfotografía de bacilos Gram positivos 100X.

Un resumen de los análisis microbiológicos realizados a los productos biofertilizantes, con dos años de almacenamiento, con especial atención a la presencia y viabilidad de microorganismos de los grupos funcionales, fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos inorgánicos se aprecia en la siguiente (Tabla 5.)

Tabla 5. Microorganismos aislados en medio NFb para fijadores biológicos de nitrógeno y SRS para solubilizadores de fósforo inorgánico a partir de los productos biofertilizantes KODIAK y MBE.

Microorganismo o cepa	Fijadora Biológica de Nitrógeno	Solubilizadora de fosfato inorgánico [Ca ₃ (PO) ₄]
<i>Bacillus subtilis</i> K1	-	(-) halo. (+) acidificación
<i>Bacillus firmus</i> C2	C2 (MBE)	(-) halo. (+) acidificación
<i>Bacillus sphaericus</i> C3	-	(-) halo. (+) acidificación

Los resultados anteriores resumidos en la Tabla 5. Indican el haberse encontrado solo una cepa fijadora biológica de N₂, *B. firmus* en el producto MBE. Todas las cepas acidificaron el medio SRS, para detectar preliminarmente actividad solubilizadora de fosfatos, pero no formaron halos.

9. CONCLUSIONES

- ❖ Las dos muestras de los biofertilizantes evaluados, KODIAK y MBE se caracterizaron por presentar microorganismos endosporados, especies de *Bacillus*, los cuales permitieron una viabilidad de los inoculantes microbianos mayor a cuatro años de almacenamiento en condiciones ambientales de Bogotá.
- ❖ En el biofertilizante KODIAK se aisló una sola especie, *Bacillus subtilis*. Lo que concuerda con la composición, de una población pura, dada en la etiqueta del producto.
- ❖ El producto EMB contiene dos inoculantes pertenecientes a cepas de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus firmus*, no indicados en la composición de la etiqueta y reconocidos en la literatura en el biocontrol de larvas de insectos y fitopatógenos respectivamente.
- ❖ La cepa de *Bacillus firmus*, aislada en el medio de NFb contenida en el biofertilizante EMB, presenta capacidad potencial como fijadora biológica de nitrógeno.
- ❖ Ninguna cepa (*B. subtilis*, *B. sphaericus* y *B. firmus*) formó halos de solubilización en el medio SRS, pero sí acidificaron el medio. Probablemente su actividad promotora de crecimiento en plantas, atribuida en la etiqueta, se deba entre otros factores a la colonización rizosférica, que puede dificultar la posterior colonización de microorganismos fitopatógenos.

10. RECOMENDACIONES

De la presente investigación surgen las siguientes recomendaciones:

- ❖ Para verificar con certeza la especie se recomienda utilizar un sistema analítico de identificación rápida para *Bacillus* API 50 CHB y en lo posible pruebas de identificación molecular.
- ❖ Realizar evaluaciones cuantitativas en Medio Líquido y determinar la capacidad de solubilización de fosfatos inorgánicos.
- ❖ Evaluar los biofertilizantes utilizados en este estudio a nivel de campo y determinar sus beneficios a nivel del crecimiento y producción de las plantas.
- ❖ Determinar la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal por parte de los microorganismos, para poder valorar su utilidad y aprovechar al máximo sus capacidades.

11. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Anderson, T.H. 2003 Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Ag. Ecosys. Environ.* 98: 285-293.
- ❖ Balows, A. 1988. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.* Second Edition. Editorial Springer. New York.
- ❖ Bergeys D, 1989 - 2000. *Manual of the Determinative Bacteriology.* Night Edition. Philadelphia 2 : 540-589.
- ❖ Bowen, J.E. Krathy. 1994. Nitrógeno, fijación Biológica en leguminosas tropicales. En *Agricultura de las Américas* .Vol. 13 No 12. pg 12-20.
- ❖ Choong-Min Ryu, Chia-Hui Hu, Robert D. Locy and Joseph W. Kloepper. 2005. Estudio de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal inducido por rizobacterias en *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil.* 26: 285-292.
- ❖ Cunningham y K. Kuyak .1992. Production of Citric and Oxalic Acid and Solubilization of Calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1451-1458.
- ❖ ICA. 2004. *Uso de microorganismos con potencial como biofertilizante en el cultivo de mora.* Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Bogotá.
- ❖ Koneman. E.W 2001. *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color.* Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- ❖ Lagunas, J. Zabaleta, E. Aranda, S. 2001 *Bacillus firmus* utilizado como controlador biológico de *Phytophthora capsici* Leo. En *Jitomate (Lycopersicon esculentum Mill)*. Instituto de Fitopatogenicidad. México 16: 15-29.
- ❖ Filipon, Z. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture Ecosystems & Environment.* 2002: 88 169-174
- ❖ Gualdrón, C. Suárez, A, Valencia, H. 1997. Microorganismos aislados del Suelo del Paramo de Chisacá Colombia. *Caldasia* 19 (1-2): 233-245.
- ❖ Madigan, M.T. Martinko, J.M. Parker, J. 1998. *Brock Biology of Microorganisms.* Prentice Hall. Iberia. Madrid.
- ❖ Osorio, N.W. 2000 *Aislamiento y evaluación in vitro de microorganismos solubilizadores de fósforo en suelos tropicales.* Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá.

- ❖ Pankhurst, C. Doube B.M 1997. Biological Indications of Soil Health.CAB International Whashington, USA.
- ❖ Poinar, G.O., Thomas, G.M. 1978 Diagnostic manual for the identification of insect pathogens. Plenum Press, New York.
- ❖ Rodríguez, H.M .E Rubiano.2002 Aislamiento e identificación de hongos solubilizadores de fosfatos aislados de cultivos de arroz y evaluación del pH y concentraciones de Sacarosa y cloruro de sodio sobre su actividad solubilizadora. Trabajo de Grado de la Pontificia Universidad Javeriana Bogotá.
- ❖ Rodriguez Hay. R Fraga.1999 .Phosphate Solubilizing Bacteria and their Role in Plant Grow Promotion. Biotechnology Advances 17:319-339.
- ❖ Roger, P.A., Zimmerman, W.J., Lumpkin, T.A. 1996. Microbiological management of wetland rice fields. En: Metting, F.B. (Ed). Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker, Inc. New York pp: 417-455
- ❖ Roveda, G., Ramirez, M., Bonilla, R. 2007 Uso de Microorganismos con potencial como biofertilizantes en el cultivo de mora.Corpoica.Tibaitata.
- ❖ Sundara, Shinha, M. 1963.Organis phosphate solubilizers in soil. Soil Science and Plant Nutrition.9 (2):45-49
- ❖ Valencia 2005 .Manual de prácticas en microbiología. Facultad de Ciencias.Departamento de Biología.Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- ❖ Valero. V.N. 2003 Potencial biofertilizantes de bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fosfatos al cultivo de arroz (orizana sativa l.) .Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias.Departamento de Biología.Universidad Nacional de Colombia. Bogotá
- ❖ Whitelaw, M. 1999. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advances in Agronomy, 69: 51-99.

12. ANEXOS

Medios de cultivo utilizados para esta investigación

1. Medio de cultivo (SRS)

Medio para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato de acuerdo a Sundara Rao & Sinha, (1963). El medio SRS no lleva indicador de pH, contiene el fosfato trialcalico precipitado (no soluble) y por lo tanto no disponible.

Componentes en g. L⁻¹

(NH ₄)SO ₄	0.5
KCL	0.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
MnSO ₄ .H ₂ O	0.004
FeSO ₄ .H ₂ O	0.002
NaCl	0.2
Glucosa	10.0
Extracto de Levadura	0.5
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0
Agar	16.0
Agua destilada	1000 ml
Púrpura de bromocresol (opcional)	0.1 g.

2. Medio selectivo para NFB

Caldo de cultivo selectivo para asilar bacterias fijadoras de N₂.

Componentes en g. L-1

KH ₂ PO ₄	0.2
K ₂ HPO ₄	0.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2.
CaSO ₄	0.1
MoO ₃	0.001
Sacarosa	5.0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.04
Agar	15
Agua destilada	1000 ml
Azul de Bromotimol	0,5
pH 7.6	