



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos,
Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido
Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos
Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica
Colombiana**

Vanessa Otero Jiménez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2011

**Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos,
Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido
Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos
Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica
Colombiana**

Vanessa Otero Jiménez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Microbiología

Director: Ph. D. Fernando Rodríguez Villamizar

Codirectora: M. Sc. María Teresa Reguero

Línea de Investigación:

Microbiología de Suelos y Microbiología Molecular

Grupo de Investigación:

Microbiología y Nutrición Animal del Trópico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2011

***A mapasawa porque los amo y siempre
están conmigo.***

Agradecimientos

- A Dios por ser mi todo.
- A mi Familia, por apoyarme en todo momento y ocasión, ser mi polo a tierra y ser mi porque para seguir adelante.
- A la Universidad Nacional de Colombia por prestarme las instalaciones y brindarme unos maestros excelentes quienes colaboraron en mi educación en la Maestría en Ciencias.
- A Corpoica – Tibaitatá y en especial al Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) en cabeza de la Dra. Alba Marina Cotes, por permitirme realizar mi trabajo de grado en sus instalaciones.
- A la directora de la Maestría la docente Martha Fontanilla, quien con su disposición para la enseñanza me demostró que la docencia es otra profesión.
- A mi director de tesis Fernando Rodríguez, por enseñarme a “vender” una idea y enseñarme que de las cosas malas también se aprende.
- A mi codirectora María Teresa Reguero, por enseñarme que siempre debo seguir mis sueños para llegar a ser quien quiero ser.
- Al docente Emiliano Barreto por el apoyo en los ensayos bioinformáticos.
- Al Dr. Michael Hume por los ensayos de pirosecuenciación.
- Al Laboratorio de Microbiología de Suelos en cabeza de la Dra. Ruth Bonilla; en especial a Iván, Melisa y Mauricio, por su paciencia, dedicación y apoyo en la realización de parte de mis ensayos junto a su compañía.
- A Socorro Prieto por ser mi voz de aliento y apoyo en la lejanía de mi hogar.
- A Luzmi mi amiga en las buenas y sobre todo en las malas, no puedo decir nada más que gracias.
- A Male por su amistad sincera, por ser mi guía y un modelo a seguir, por no dejarme de insistir en que debo luchar por lo que quiero y dejar lo que no me sirve a un lado.
- A Dito mi amigo, mi confesor, gracias por tu apoyo cuando más lo necesitaba.

- A Yami por escucharme y acompañarme en los momentos más duros de mi tesis.
- A Liss porque fuiste me acompañaste en el primer momento, por estar conmigo.
- A Mimí por su amistad que incluyó lo académico y lo cultural.
- A Guille por la colaboración en los análisis de metagenómica.
- A Mis nortes CJ Monto y Manu quienes nunca dejaron de insistir y alentarme en todo momento.
- A Dianis, Sandris, Paulis, Quintanaso por ser mis primeros impulsores.
- A todos mis compañeros de CORPOICA Andi, Aleja, Dito, Edwiñai, Pipe, Dani, Toña, Julito, Meli, JuanDa, Jazz, Naty, Tatis, Charly, Fabis, Rochy, Dianis, gracias por la amistad, los días y las noches compartidas.
- A mis compañeros de maestría en especial a Caro y Oscar.

Resumen

El cultivo de plátano, requiere fertilización continua y uso de agroquímicos, deteriorando el medio ambiente y aumentando costos en la producción. Una alternativa a esta problemática es el uso de microorganismos nativos, capaces de proveer los nutrientes necesarios y disminuir el uso de agroquímicos. Este trabajo buscaba aislar, seleccionar e identificar Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas y Bacterias Ácido Lácticas con potencial biofertilizante, en suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana. Se aislaron 30 actinomicetos, 15 bacterias ácido lácticas y 28 bacterias fotosintéticas no sulfurosas. Estos aislamientos presentaron actividad solubilizadora de fosfato, fijadora de nitrógeno, degradadora de materia orgánica y antagonista de patógenos, adicionalmente los aislamientos fueron identificados molecularmente por secuenciación del gen 16S rRNA. En conclusión los suelos de los municipios mostrados poseen microorganismos con potencial capacidad promotora de crecimiento vegetal.

Palabras claves: *Streptomyces*, *Lactobacillus*, *Rhodopseudomonas*, metagenómica.

Abstract

Plantain production need fertilization continuous and use of agrochemicals, their deteriorating the environment and increasing production cost. An alternative to this problem is the use of native microorganisms capable of providing the necessary nutrients for reduce the use of agrochemicals. This study sought to isolate, select and identify actinomycetes, photosynthetic non sulfur bacteria and acid lactic bacteria with potential biofertilizer in soils associated with the cultivation of plantain in the Atlantic Coast Colombian. 30 actinomycetes, 15 acid lactic bacteria and 28 photosynthetic non sulfur bacteria were isolated. The isolated presented phosphate solubilization activity, nitrogen fixing, antagonism against pathogens, additional isolates were molecular identified by 16S rRNA gene sequencing. In conclusion the soils sampled have microorganisms with potential plant growth promoters.

Palabras claves: *Streptomyces, Lactobacillus, Rhodopseudomonas, metagenomic.*

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de fotografías	XVII
Lista de símbolos y abreviaturas	XX
Introducción	1
1. Capítulo 1: Cultivo de plátano, problemática y alternativas.....	5
1.1 Generalidades del plátano	5
1.2 Producción mundial y nacional de plátano	5
1.3 Cultivo de plátano	6
1.3.1 Condiciones edafoclimáticas	6
1.3.2 Fertilización en el cultivo de plátano.....	7
1.3.3 Problemática en el cultivo de plátano	8
1.3.4 Alternativas al manejo fitosanitario y de fertilización en el cultivo de plátano.....	9
1.3.5 Uso de bacterias para estimular el crecimiento de plantas	10
1.4 Objetivo general.....	10
2. Capítulo 2: Microorganismos eficientes	11
2.1 Actinomicetos	11
2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)	12
2.3 Bacterias fotosintéticas no sulfurosas (BFNS)	13
2.4 Objetivo específico	14
2.5 Metodología.....	14
2.5.1 Definición de las zonas homogéneas y sitios de muestreo.....	14
2.5.2 Toma de muestras de los suelos para análisis físicoquímicos y microbiológicos en las zonas definidas.....	14
2.5.3 Aislamiento de bacterias ácido lácticas	15
2.5.4 Aislamiento de bacterias fotosintéticas no sulfurosas.....	15
2.5.5 Aislamiento de actinomicetos	16
2.5.6 Conservación de aislamientos.....	17
2.6 Resultados y Discusión.....	17
2.6.1 Descripción de la zona de estudio municipio de Dibulla	17
▪ Generación del mapa de muestreo	18

2.6.2	Descripción de la zona de estudio municipio de Curumaní	18
▪	Generación del mapa de muestreo	18
2.6.3	Descripción de la zona de estudio municipio de María la Baja	19
▪	Generación del mapa de muestreo	19
2.6.4	Muestras de suelos en las zonas definidas	20
2.6.5	Análisis de las características físicoquímicas de las muestras	21
2.6.6	Análisis microbiológicos de las muestras colectadas	24
2.6.7	Aislamiento de bacterias ácido lácticas	25
2.6.8	Aislamiento de bacterias fotosintéticas no sulfurosas	26
2.6.9	Aislamiento de actinomicetos	29
2.6.10	Identificación de los aislamientos en estudio	30
3.	Capítulo 3: Propiedades de microorganismos eficientes como bacterias promotoras de crecimiento	31
3.1	Producción de indoles totales	31
3.2	Antagonismo	32
3.3	Degradación de celulosa, xilano y quitina	33
3.4	Solubilización de fosfato	34
3.5	Fijación de nitrógeno	35
3.6	Objetivo específico	36
3.7	Metodología	36
3.7.1	Producción de indoles totales	36
3.7.2	Evaluación de actividad antagonista <i>in vitro</i> contra bacterias patógenas para el cultivo de plátano	37
3.7.3	Perfil enzimático por medio de la degradación de azúcares (celulosa, xilano y quitina)	38
3.7.4	Solubilización de fosfatos	39
3.7.5	Fijación de nitrógeno	40
3.7.6	Diseño estadístico	41
3.8	Resultados y Discusión	41
3.8.1	Producción de indoles totales	41
3.8.2	Evaluación de actividad antagonista <i>in vitro</i> contra bacterias patógenas para el cultivo de plátano	44
3.8.3	Perfil enzimático por medio de la degradación de azúcares (celulosa, xilano y quitina)	48
3.8.4	Solubilización de fosfatos	53
3.8.5	Fijación de nitrógeno	57
4.	Capítulo 4: Identificación molecular y diversidad microbiana	61
4.1	Diversidad microbiana del suelo	61
4.2	Objetivo específico	62
4.3	Metodología	62
4.3.1	Recuperación de biomasa para extracción de DNA de BFNS Actinomicetos y BAL	62
4.3.2	Extracción de DNA	63
4.3.3	Identificación molecular para el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL)	63

4.3.4	Identificación molecular para el grupo de bacterias fotosintéticas no sulfurosas (BFNS).....	64
4.3.5	Identificación molecular para el grupo de los actinomicetos	64
4.3.6	Confirmación de PCR.....	64
4.3.7	Identificación molecular de la presencia del gen <i>nifH</i> para confirmar la presencia de la enzima nitrogenasa	65
4.3.8	Identificación molecular de 16S rRNA para los aislados.....	65
4.3.9	Secuenciación.....	66
4.3.10	Análisis de las secuencias	66
4.3.11	Análisis de diversidad microbiana	66
4.4	Resultados y Discusión.....	69
4.4.1	Identificación molecular grupo funcional bacterias ácido lácticas	69
4.4.2	Identificación molecular grupo funcional bacterias fotosintéticas no sulfurosas.....	70
4.4.3	Identificación molecular grupo funcional actinomicetos	71
4.4.4	Identificación <i>nifH</i>	71
4.4.5	Análisis de las secuencias ribosomales del 16S rRNA de los aislados de tres grupos funcionales: BAL, BFNS y actinomicetos	72
4.4.6	Análisis de diversidad microbiana	81
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	89
5.1	Conclusiones	89
5.2	Recomendaciones	91
A.	Anexo A: Mapa de zonas homogéneas de Dibulla – Curumaní – María la Baja.	93
B.	Anexo B: Análisis físico – químico de suelos de Dibulla – Curumaní – María la Baja.....	97
C.	Anexo C: Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas – Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas – Actinomicetos.....	99
D.	Anexo D: Características macroscópicas de aislamientos de actinomicetos .	103
E.	Anexo E: Indoles Totales.....	105
F.	Anexo F: Agar Carboximetilcelulosa – Xilano – Quitina.....	107
G.	Anexo G: Agar Pikovskaya – SMRS – Composición de Roca Fosfórica – Curva de calibración de fosfatos- Resultados ANOVA	109
H.	Anexo H: Agar Ashby – Agar jNfb – Curva patrón acetileno -	113
I.	Anexo I: Halos de acidificación y PSE para actinomicetos.....	115
J.	Anexo J: Salidas de SAS para Solubilización de fosfato por parte de BAL y actinomicetos. Salida de SAS para fijación de nitrógeno por parte de BAL y actinomicetos.....	117
	Bibliografía	121

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Planta de plátano.....	5
Figura 2-1: Distribución de pH en los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja.....	21
Figura 2-2: Distribución de materia orgánica (alto>3, medio 2 a 3, bajo<2), fósforo (alto>30, medio 15 a 30, bajo <15) y potasio (alto>0,6 medio 0,3 a 0,6 bajo<0,3) en suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja.....	22
Figura 2-3: Distribución de los elementos secundarios calcio (alto>6, medio 3 a 6, bajo<3), magnesio (alto>2,5, medio 1,5 a 2,5, bajo<1,5) y azufre (alto>20, medio 10 a 20, bajo<10).....	23
Figura 2-4: Distribución de los elementos secundarios hierro (alto>50, medio 50 a 25, bajo<3), cobre (alto>3, medio 1 a 3, bajo<1), manganeso (alto>10, medio 10 a 5, bajo<5), zinc (alto>3, medio 3 a 1,5, bajo<1,5) y boro (alto>0,4, medio 0,4 a 0,2, bajo<0,2).....	23
Figura 3-1: Producción de indoles totales en 15 cepas de actinomicetos aislados de rizosfera de plátano adicionalmente se presenta el control <i>Azotobacter chroococcum</i> (AC).....	42
Figura 3-2: Comparación de tamaños de halos de degradación de carboximetilcelulosa por parte de los actinomicetos en comparación a la cepa control.....	49
Figura 3-3: Comparación de tamaños de halos de degradación de xilano por parte de los actinomicetos en comparación a la cepa control.....	51
Figura 3-4: Comparación de tamaños de halos de hidrólisis de quitina por parte de los actinomicetos en comparación a la cepa control.....	52
Figura 3-5: Reducción de acetileno en comparación a la cepa control.....	60
Figura 4-1: Análisis filogenéticos de aislados de BAL basados en las secuencias nucleotídicas de 16S rRNA.....	75

Figura 4-2:	Análisis filogenéticos de secuencia nucleotídica de 16S rRNA de aislados de BFNS.....	77
Figura 4-3:	Análisis filogenéticos de aislados de actinomicetos basados en las secuencia nucleotídicas de 16S rRNA.....	80
Figura 4-4:	Curvas de rarefacción, describen el efecto del porcentaje de disimilaridad sobre el número de OTUs identificados.....	82
Figura 4-5:	Estimativo de la riqueza de especies obtenidas a una distancia genética de 3% de disimilaridad.....	84
Figura 4-6:	Distribución porcentual de las secuencias clasificadas como bacterias y las no clasificadas.....	84
Figura 4-7:	Distribución de cada uno de los <i>phylum</i> representativos en cada municipio.....	85
Figura 4-8:	Número de filotipos observados en relación al número de secuencias obtenidas a un 3% de disimilaridad.....	87

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Procedencia geográfica de las 9 muestras tomadas en el municipio de Dibulla, especificando la zona homogénea de procedencia	18
Tabla 2-2: Procedencia geográfica de las 7 muestras tomadas en el municipio de Curumaní, especificando la zona homogénea de procedencia	19
Tabla 2-3: Procedencia geográfica de las 5 muestras tomadas en el municipio de María la Baja, especificando la zona homogénea de procedencia.....	20
Tabla 2-4: Recuento de bacterias totales de las primeras seis muestras de suelo del municipio de Dibulla para las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 y un promedio de las mismas.....	25
Tabla 2-5: Recuento de hongos filamentosos totales de las primeras seis muestras de suelo del municipio de Dibulla para las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 y un promedio de las mismas.....	25
Tabla 3-1: Diámetro de halos de inhibición formados en agar nutritivo por los 15 aislamientos de BAL contra las bacterias patógenas.....	45
Tabla 3-2: Diámetro de halos de inhibición formados en agar nutritivo por los 33 aislamientos de actinomicetos contra las bacterias patógenas....	47
Tabla 3-3: Porcentaje de solubilización de fosfato realizado por bacterias ácido lácticas tanto en medio SRS suplementado con carbonato de calcio, como en medio SRS suplementado con roca fosfórica a las 24 y 48 horas de incubación.....	54
Tabla 3-4: Solubilización cuantitativa de fosfatos por bacterias ácido lácticas.....	56
Tabla 3-5: Solubilización cuantitativa de fosfatos por actinomicetos.....	56
Tabla 4-1: Iniciadores utilizados para la amplificación de la región 16S rRNA...	65
Tabla 4-2: Comparación de secuencias de la región 16S rRNA de los aislamientos de BAL con la base de datos de NCBI y con la base de datos del RDP.....	73

Tabla 4-3: Comparación de secuencias de la región 16S rRNA de los aislamientos de BFNS con las bases de datos NCBI y RDP, se muestra el valor E y el porcentaje de identidad reportada por NCBI.	75
Tabla 4-4: Comparación de secuencias de la región 16S rRNA de los aislamientos de actinomicetos con la bases de datos NCBI y RDP..	78
Tabla 4-5: Estimativo de la riqueza de especies obtenidas a una distancia genética de 0 (unique), 3, 5 y 10%.....	83

Lista de fotografías

	Pág.
Fotografía 2-1: Toma de muestra para análisis químicos. (A) Excavación a 30 cm para la toma de muestra (B) Muestra compacta de aproximadamente 1 kg.....	14
Fotografía 2-2: Toma de muestra realizada para análisis físico del suelo. A. Upland para la toma de muestra B. Upland con la muestra de suelo.....	15
Fotografía 2-3: Montaje de columna de Winogradsky donde se observa zona color naranja luego de cuatro semanas de incubación.....	16
Fotografía 2-4: Montaje de láminas cubre objetos sobre el medio de cultivo agar avena para la recolección de muestras miceliales y análisis microscópicos.....	17
Fotografía 2-5: A. Cultivo de bacterias ácido lácticas en agar MRS. A. Coloración de Gram, se observan bacilos Gram positivos.....	26
Fotografía 2-6: Columna de Winogradsky.....	27
Fotografía 2-7: A. Crecimiento de BFNS sembrados con la dilución 10^2 a partir de a columna de Winogradsky. B. Coloración de Gram a partir del cultivo de BFNS. Aumento 100 X.....	28
Fotografía 2-8: Aislamiento de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas en agar <i>Rhodopseudomonas medium</i>	29
Fotografía 2-9: A. Aislamiento de actinomicetos sobre agar avena suplementado con nistatina mostrando la producción de metabolitos. B. Fotografía microscópica de actinomiceto donde se observa su estructura en espiral.....	30
Fotografía 3-1: Producción de indoles totales. Tubo 1: Control negativo, Tubos 2-4: Control positivo, Tubos 5-7: aislamiento 9DA.....	42
Fotografía 3-2: Antagonismo por bacterias ácido lácticas contra <i>E. caratovora</i> . Halo de inhibición del aislamiento 24DB.....	44

Fotografía 3-3:	Antagonismo contra <i>Fusarium</i> por actinomicetos; en la fotografía se observan los aislamientos 70BA (no antagónico contra <i>Fusarium</i>), 71DA y 78BA, estos dos últimos presentan halos de inhibición frente al patógeno a 3 días de exposición..	46
Fotografía 3-4:	Halo de degradación de celulosa realizado por el aislamiento 48CA en agar CMC.....	49
Fotografía 3-5:	Degradación de xilano realizado por el aislamiento 89DA del municipio de Dibulla sobre agar xilano.....	50
Fotografía 3-6:	Halo de hidrólisis de quitina realizado por el aislamiento 50CA en agar suplementado con quitina coloidal.....	52
Fotografía 3-7:	Solubilización de fosfatos por actinomiceto (47CA) en agar Pikovskaya.....	54
Fotografía 3-8:	Solubilización de fosfatos por actinomicetos en agar SRS con roca fosfórica (43CA, 45CA, 46CA y 50CA).....	55
Fotografía 3-9:	Prueba cuantitativa de solubilización de fosfatos.....	56
Fotografía 3-10:	Crecimiento de bacterias en agar Ashby.....	58
Fotografía 3-11:	Crecimiento de BFNS en medio jNfb.....	58
Fotografía 3-12:	Crecimiento de actinomicetos en medio jNfb.....	59
Fotografía 4-1:	Extracción de DNA total de bacterias ácido lácticas (BAL), actinomicetos y bacterias fotosintéticas no sulfurosas (BFNS). Carril 1: Bacteria fotosintética (aislamiento 9DF); Carriles 2-5: Actinomicetos (aislamientos 71BA, 72BA, 76BA, 78BA); Carriles 5-7: Bacterias ácido lácticas (aislamientos 40CB, 41CB).....	69
Fotografía 4-2:	Amplificación de DNA de bacterias ácido lácticas utilizando iniciadores específicos. Carril 1: Marcador de peso molecular (Hyperladder V, BIOLINE); Carril 2: Control negativo; Carril 3: Control positivo (<i>L. plantarum</i>), Carriles 4-10: aislamientos 1DB, 5DB, 18 DB, 19DB, 40CB, 44CB, y 61BB.....	70
Fotografía 4-3:	Amplificación de DNA de bacterias fotosintéticas no sulfurosas utilizando primers específicos. Carril 1: Marcador de peso molecular (Hyperladder V, BIOLINE); Carril 2-12: 22CF, 13CF, 14CF, 16CF, 17CF, 18CF, 20CF, 21CF, 30CF, 31CF, 35CF....	70
Fotografía 4-4:	Amplificación de DNA de actinomicetos utilizando primers F1 y R5. Carril 1: Marcador de peso molecular (Hyperladder V, BIOLINE); Carril 2: control positivo, Carril 3: control negativo, Carril 4-12: 2DA, 7DA, 20DA, 28DA, 30DA, 35CA, 36CA, 52CA y 57CA.....	71

Fotografía 4-5: Amplificación del gen <i>nifH</i> de 378 pb, en los aislamientos 1DF, 2DF, 4DF, 7DF, 9DF, 14CF, 13CF, 16CF, 17CF, 18CF, 20CF, 21CF, 22CF, 23CF, 30CF, 31CF, 33CF, 36CF, 40CF, marcador de peso molecular, Control positivo, Control negativo.....	72
--	----

Lista de símbolos y abreviaturas

Superíndices

Superíndice	Término
<i>n</i>	Exponente, potencia

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>BST</i>	Bosque Seco Tropical
<i>cm</i>	Centímetro
<i>Da</i>	Daltons
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiamino tetracético
<i>g</i>	Gramos
<i>h</i>	Horas
<i>ha</i>	Hectáreas
<i>kg</i>	Kilogramos
<i>min</i>	Minutos
<i>ml</i>	Mililitros
<i>mM</i>	MiliMolar
<i>m.s.n.m.</i>	Metros sobre el nivel del mar
<i>nm</i>	Nanómetros
<i>SDS</i>	Dodecil Sulfato de Sodio
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto

Introducción

El plátano una planta monocotiledónea perteneciente a la familia *Musaceae*; según la FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), “es la fruta más exportada del mundo y el cuarto producto alimenticio básico más importante del globo después del arroz, el trigo y el maíz en términos de valor de producción” (Palencia, *et al.*, 2006; Matthews, 2006).

Según estadísticas de la FAO, el primer productor de plátano del mundo es Uganda seguido por Nigeria, Ghana y Colombia, ubicada en el cuarto lugar sin embargo, a pesar de que Colombia exporta pocos volúmenes obtiene mayores rendimientos en cuanto a precios, lo que hace que se encuentre ubicada en el primer lugar de exportadores a nivel mundial (Ruiz & Urueña, 2009).

En Colombia el plátano se produce en un área de aproximadamente unas 400,000 ha distribuidas entre Urabá, los Llanos orientales y la zona cafetera; genera aproximadamente 286 mil empleos directos permanentes al año, con una producción de 3.5 millones de toneladas, distribuidas entre el consumo de la agroindustria, exportación y consumo en hogares locales principalmente. El cultivo de plátano es una de las actividades tradicionales campesinas más ampliamente distribuidas en Colombia, de gran importancia socioeconómica en cuanto a la generación de empleo rural y subsistencia de pequeños productores (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010; Ruiz & Urueña, 2009; Martínez, *et al.*, 2006).

La agricultura convencional que se ha venido desarrollando en las últimas décadas se fundamenta en el uso intensivo de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas), que conlleva a la degradación de los suelos por pérdida de las propiedades físicas, químicas y biológicas, debido a que, en su gran mayoría, estos productos presentan alta toxicidad, alterando las comunidades microbianas y siendo fuente de contaminación de suelos y de aguas superficiales y subterráneas.

Entre los pequeños productores existe un desconocimiento de las necesidades reales de nutrientes que requiere la plantación, lo que conlleva al uso de estos insumos químicos de manera inadecuada, dañando las funciones intrínsecas del suelo y permitiendo la aparición de enfermedades e insectos resistentes, que para su control requieren de otros insumos más tóxicos, convirtiéndose en un círculo vicioso, que afecta negativamente la calidad, cantidad y rentabilidad del producto (Bolaños, *et al.*, 2002).

Además el insuficiente monitoreo por parte de autoridades, sobre los residuos químicos presentes en frutas y hortalizas y la gran oferta de alternativas químicas a bajo costo y de amplio grado de toxicidad, hacen que el productor aplique un producto de mayor capacidad tóxica (<http://www.manualdelombricultura.com>). Esto, sumado a la excesiva erosión del suelo, el transporte de sedimentos y el inapropiado tratamiento de desechos

humanos y animales, ha causado serios problemas sociales y ambientales en el mundo (Higa, *et al.*, 1994). Las plantaciones bananeras no son la excepción; países como Colombia, Ecuador, Panamá y Costa Rica muestran oscilaciones en la producción durante la última década, mientras que aquellos países que trabajan en una agricultura más orgánica presentan una estabilidad en la producción (Rosales, *et al.*, 2006).

Hoy en día la producción de plátano orgánico es realizada en su mayoría por pequeños agricultores, por carecer de medios para aplicar las recomendaciones tecnológicas modernas. Los de mayor capacidad económica lo hacen porque han descubierto una oportunidad de hacer negocio, al mismo tiempo que se ajustan a las exigencias cada vez más fuertes de un sector consumidor que demanda mayor protección del ambiente, especialmente en lo que a uso de plaguicidas se refiere.

Las nacientes perspectivas que oferta la agricultura orgánica (ecológica) para el ambiente y para la sociedad, ha llevado a que se le preste mayor atención al estudio de microorganismos asociados a las raíces de las plantas y a sus beneficios para la agricultura. Por esta razón hemos planteado la siguiente hipótesis: ***“En los suelos de los pequeños productores de plátano de la Costa Atlántica se encuentran microorganismos localmente adaptados con capacidad biofertilizante”***.

Con base en la problemática descrita anteriormente, en los últimos años se ha buscado desarrollar alternativas que permitan disminuir el efecto nocivo residual que dejan los agroquímicos, mejorar el equilibrio biológico y la fertilidad del suelo. En este contexto la agricultura ecológica incluye el uso de biofertilizantes; una mezcla de microorganismos benéficos presentes naturalmente en el suelo, que al ser aplicados pueden restaurar nutricional y biológicamente suelos degradados; permite una producción a bajo costo, favorecen la productividad a largo plazo y son asequibles a los productores, con disminución de la contaminación del medio ambiente y la conservación del suelo desde su biodiversidad y fertilidad (Rosales, *et al.*, 2006). Con este tipo de agricultura se promueve un aumento en la calidad y precio del producto y de esta manera se mejora la rentabilidad bruta del cultivo (Ramírez, *et al.*, 2008; Mejía, 2009).

Uno de los elementos más valiosos que se pueden utilizar en la producción de estos biofertilizantes es el uso de microorganismos promotores de crecimiento de plantas localmente adaptados. Sin embargo, en la agricultura orgánica el uso y manejo de biofertilizantes, muchas veces presenta problemas relacionados al escaso conocimiento de las especies presentes en los agroecosistemas y en la rizósfera de los cultivos. Desde el punto de vista ecológico, se hace necesario conocer los integrantes de la comunidad bacteriana donde se localiza el cultivo, con el fin de potenciar su acción y favorecer su posterior aplicación como inoculantes (Terry, *et al.*, 2005).

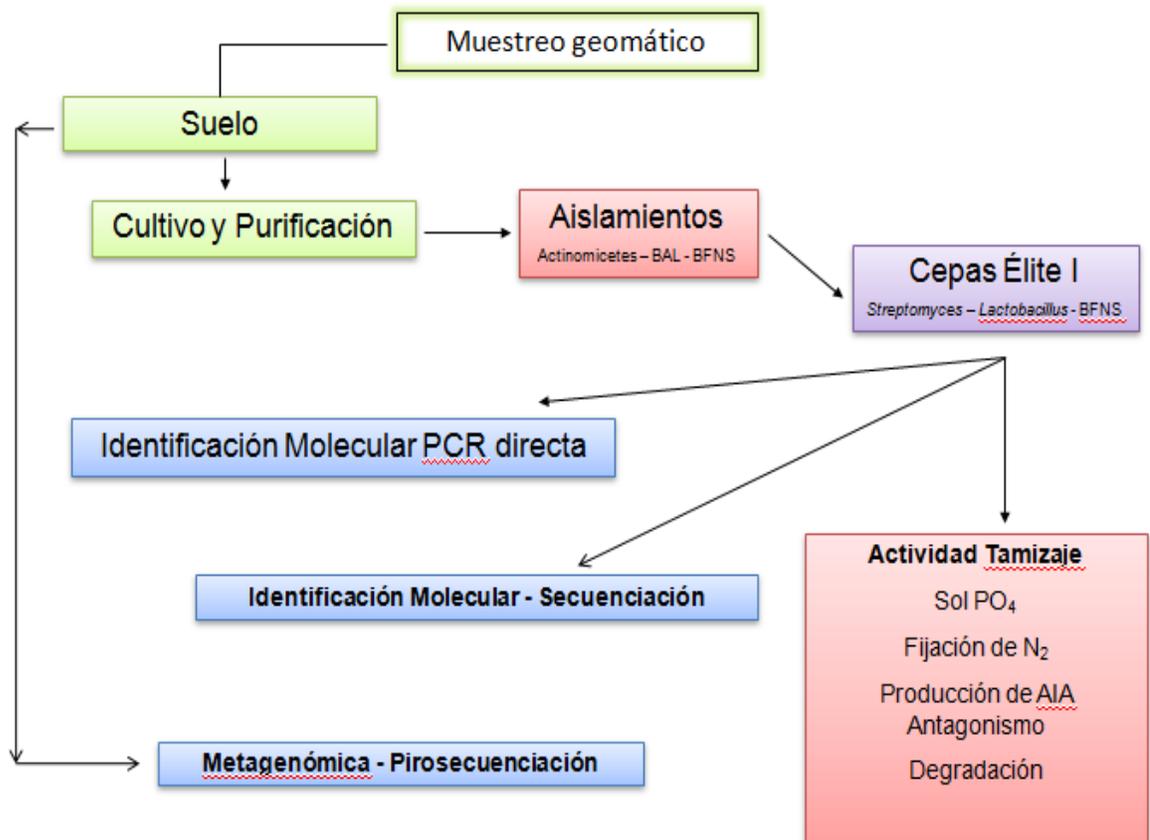
Esta microbiota de la rizósfera puede acelerar el crecimiento de las plantas a través de reguladores de crecimiento vegetal, al aumentar la velocidad de germinación de semillas, estimular la formación de raíces, fortalecer los mecanismos naturales de defensa de la planta a enfermedades e insectos patógenos, incrementar la respuesta a la fertilización química u orgánica y aumentar la tolerancia al estrés hídrico; todo esto promueve mejores efectos sobre la calidad del suelo y la cosecha, efectos que se buscan sean permanentes durante el ciclo de desarrollo del cultivo (Higa, *et al.*, 1994; Galindo, *et al.*, 2006; Terry, *et al.*, 2005). Los efectos benéficos de los microorganismos promotores de crecimiento de las plantas han sido reportados con anterioridad para diferentes cultivos como herbáceas, papa, frijol, soya, cítricos, banano, entre otros. Las bacterias frecuentemente reportadas son cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*,

Azotobacter, *Enterobacter* y *Serratia* (Jaizme-Vega, *et al.*, 2003; Rivera-Cruz, *et al.*, 2008), de igual forma se reportan *Lactobacillus*, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y actinomicetos.

Con el fin de promover este tipo de producción limpia, que favorece la salud de productores, consumidores, el ambiente y que es de bajo costo, es necesario identificar cuáles microorganismos del suelo que son más eficientes en su interacción favorable con las otras comunidades microbianas. Estas interacciones podrían promover relaciones benéficas entre los factores bióticos y abióticos que permitan, finalmente, el crecimiento y la salud del cultivo de plátano de los pequeños productores de la Costa Atlántica Colombiana.

El objetivo del presente estudio fue aislar, seleccionar e identificar microorganismos de los grupos actinomicetos, bacterias ácido lácticas y bacterias fotosintéticas no sulfurosas, con potencial biofertilizante, en suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica colombiana, que en un futuro cercano puedan ser empleados como bioinsumos por parte de los pequeños productores en el cultivo de plátano (en cada capítulo se plantea el objetivo específico para alcanzar este objetivo general).

Para alcanzar este objetivo general, se planteó el siguiente enfoque metodológico:



Este estudio de investigación abarca cinco capítulos, el primer capítulo comprende el marco teórico acerca del cultivo de plátano, la problemática del mismo, las alternativas a dicha problemática y el objetivo que se constituye en la línea directriz durante todo el proceso de la investigación; el segundo describe los microorganismos de interés para el

estudio, los beneficios del uso de estos microorganismos, su proceso de aislamiento y los resultados obtenidos; en el tercero, se exponen las diversas propiedades de los microorganismos eficientes de interés en nuestro estudio, como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, la metodología utilizada para recolectar, organizar y analizar los datos y los resultados obtenidos; en el cuarto se presenta el proceso de identificación a nivel molecular, así como los antecedentes internacionales para el empleo de la metagenómica (pirosecuenciación) como método alternativo para identificar la diversidad microbiana presente en los suelos de interés, adicionalmente se exponen y desarrollan los diversos métodos, instrumentos y técnicas a las cuales recurrimos, para el análisis de dichos resultados; finalmente en el quinto capítulo se declaran las conclusiones a las cuales hemos arribado y se anotan algunas sugerencias que surgen como consecuencia del trabajo a lo largo del proceso investigativo.

1. Capítulo 1: Cultivo de plátano, problemática y alternativas.

1.1 Generalidades del plátano

El plátano es una planta monocotiledónea perteneciente al orden *Escitaminales*, a la familia *Musaceae*, subfamilia *Musoideae* y al género *Musa*. Presenta entre 30 y 40 especies diploides siendo las de mayor importancia comercial *Musa acuminata* (plátano) y *Musa balbisiana* (banano) (Palencia, *et al.*, 2006).

Es una planta herbácea gigante y perenne; la fruta es de producción asexual directa, con agrupación en racimos (figura 1-1); su unidad básica de reproducción es el colino que se encuentra en el pseudotallo y su porción subterránea llamada “cormo”, produce alrededor de diez colinos más durante su vida productiva (Ruiz & Urueña, 2009).

Figura 1-1: Planta de plátano (<http://www.agronet.com.mx>)



Según la FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), “los plátanos son la fruta más exportada del mundo y el cuarto producto alimenticio básico más importante del globo – después del arroz, el trigo y el maíz – en términos de valor de producción” (Matthews, 2006).

1.2 Producción mundial y nacional de plátano

Para el año 2007 se cultivaron en el mundo 5.4 millones de hectáreas de plátano, arrojando una producción mundial de 33.9 millones de toneladas, de las cuales 24.3

millones de las toneladas (72%) producidas, se concentraron en los países africanos, el 25% en países de Centroamérica, Suramérica y el Caribe (siendo Colombia y Perú, los principales productores) y el 3% en países asiáticos (Ruiz & Urueña, 2009). Según estadísticas de la FAO, el primer productor de plátano del mundo es Uganda seguido por Nigeria, Ghana y Colombia, ubicada en el cuarto lugar. Uganda, el principal productor, produjo 9.2 millones de toneladas en el 2008, equivalentes al 27.2% de la producción mundial; le siguen en importancia Nigeria, Ghana y Colombia que participaron en el mismo año con el 8.8% (2.99 millones de toneladas), 8.6% (2.93 millones de toneladas) y 8.2% (2.78 millones de toneladas), respectivamente (Ruiz, *et al.*, 2009).

Con respecto a las exportaciones, en cuanto a volumen, los principales exportadores mundiales son Guatemala (22.3% del total), Ecuador (21.3%), Colombia (20.9%) y Perú (12.5%) sin embargo, si dichas exportaciones son ordenadas por valor, las participaciones en su orden son: Colombia (21.1%), Perú (17.4%), Guatemala (12.7%) y Ecuador (11.4%); indicando que, a pesar de que Colombia y Perú exportan menores volúmenes, obtienen mayores rendimientos en precios (Ruiz & Urueña, 2009).

Según estadísticas del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colombia (2010) se ubica como el cuarto productor y principal exportador de plátano a nivel mundial. Se produce en unas 125,000 fincas (Toomey, 2004), con un área de siembra total de aproximadamente unas 400,000 ha, que arrojan una producción de 3.5 millones de toneladas (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010), de las cuales el 1% se destina al consumo de la agroindustria, 3.64% se exporta, 10% equivalen a pérdidas en la producción y el resto se destina para el consumo local. En nuestro país, el plátano es uno de los productos alimenticios de mayor importancia en la canasta familiar, siendo el cultivo permanente con mayor acogida en los sistemas de economía campesina; El consumo per cápita estimado se encuentra cerca a los 155 kg/persona/año (Ruiz & Urueña, 2009). Este cultivo genera aproximadamente 286 mil empleos directos permanentes al año y son cerca de 57 mil familias las que se dedican a las labores del cultivo en todo el país (Martínez, *et al.*, 2006).

1.3 Cultivo de plátano

1.3.1 Condiciones edafoclimáticas

Debido a que es un cultivo tropical, el plátano puede cultivarse desde el nivel del mar hasta los 2,000 metros de altura con temperaturas promedio entre 17° y 35°C para clima cálido, siendo los 26°C la temperatura óptima (Bolaños, *et al.*, 2002). El pH apropiado oscila entre 6,5 y 7,0, aunque tolera suelos ligeramente alcalinos (Palencia, *et al.*, 2006). Este cultivo requiere lluvias prolongadas y regularmente distribuidas, con una precipitación de 120 a 150 mm de lluvia mensual o 1,800 mm de lluvia anuales bien distribuidos. La duración de una plantación es de 6 a 15 años, dependiendo de las condiciones ambientales y de las prácticas culturales (Palencia, *et al.*, 2007; Ruiz & Urueña, 2009). En Colombia este cultivo es una de las actividades tradicionales campesinas más ampliamente distribuidas, con gran importancia socioeconómica en

cuanto a la generación rural de empleo y subsistencia de pequeños productores (Martínez, *et al.*, 2006), quienes se organizan en cooperativas como la “Cooperativa de Trabajo Asociados de Biotecnología, Bioinsumos y Semillas de Curumaní – Cooprabiscur” (Curumaní), la “Cooperativa del Grupo Participativo Local de Dibulla P.B.A. - Coogrupadi” (Dibulla) y la “Asociación de Productores de María la Baja - Aproagrofor (María la Baja), las cuales participaron en este proyecto. Las variedades más cultivadas son el hartón, dominico hartón, dominico, el pelipita y el cachaco o popocho los cuales se distribuyen dependiendo de las condiciones agroecológicas a las que se adaptan dichas variedades.

Las zonas donde se encuentra localizado este cultivo van desde clima cálido a templado; a nivel nacional se encuentran tres zonas productoras importantes: Urabá con cerca de 37,000 ha destinadas solo a la exportación; los Llanos orientales con 25,000 ha y por último la zona cafetera con 162,000 ha que abastecen cerca del 65% del mercado nacional, cabe subrayar que, aunque para la zona cafetera sea mayor cantidad en número de ha, es mucho menor la producción en las mismas, debido a que el cultivo de importancia en esta zona es el café (Martínez, 2001; Martínez, *et al.*, 2006). Estas áreas ubicadas en los departamentos de Antioquia, Quindío y Meta, para el 2008, participaron con el 13.0%, 11.2% y 10.5% de la producción nacional respectivamente (Ruiz & Urueña, 2009). Cabe anotar que en la región de Urabá, los grandes productores se especializaron en banano, mientras que los pequeños productores lo hacen en la producción de plátano.

1.3.2 Fertilización en el cultivo de plátano

El proceso de fertilización de plátano se lleva a cabo en tres aplicaciones, la primera un mes después de haberse realizado la siembra, la segunda a los tres meses y la última entre el quinto y sexto mes, por año (Cuello, *et al.*, 2009). Tradicionalmente se utilizan altas concentraciones de fertilizantes químicos, especialmente nitrógeno en forma de “urea” y potasio.

Los costos de fertilización de monocultivo de plátano para exportación de un pequeño productor (menos de 10 ha), con una densidad de 1,300 plantas/ha, para un ciclo productivo de 2 años, es aproximadamente de diez millones de pesos/año. El primer año el gasto en insumos, entendiendo esto como gastos en fertilizantes, fungicidas y abonos ocupa un primer lugar en relación a los gastos generales del cultivo (cerca de cinco millones doscientos mil pesos), mientras que el resto del ciclo ocupa un segundo lugar, con un valor aproximado de tres millones trescientos mil pesos, lo que corresponde a un 33% del gasto total de la producción por hectárea (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010).

En el año 2009, en la región de los llanos orientales, los grandes productores (mayor de 30 ha) asumieron costos de producción en el primer año de cultivo, por valor de 11 millones de pesos, siendo los costos directos (85.4%) aquellos que representan un mayor rubro, especialmente los enfocados hacia los insumos como los fertilizantes edáficos (25%) sin embargo, si sumamos los costos de los fertilizantes foliares, fungicidas, insecticidas y herbicidas se llevan un alto porcentaje con un total de 10.3% en el gasto. Este patrón es similar en el mediano y pequeño productor con costos equiparables en cuanto al gasto teniendo en cuenta que las hectáreas de producción son menores (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; 2010), de igual manera sucede en los santanderes y en el eje cafetero. En el departamento de Antioquia, el único valor que

cambia es la utilización de fungicidas que tiene un mayor porcentaje (18%) que la utilización de los fertilizantes edáficos (13%). (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010)

1.3.3 Problemática en el cultivo de plátano

Son varios los factores que tienen injerencia en la problemática del cultivo de plátano como son los problemas fitosanitarios y la poca inversión en el cultivo (relacionado con los costos en la producción del mismo), esto sumado a la amplia variedad de condiciones ambientales en que se desarrolla el cultivo a través de toda la geografía colombiana, así como la diversidad en los sistemas de producción, son las principales causas de pérdidas en los mercados internacionales (Martínez, *et al.*, 2006).

Dentro de los problemas fitosanitarios que se presentan en el cultivo de plátano se encuentran varias enfermedades causadas por microorganismos implicados en bajos rendimientos en la producción como lo son:

La **Sigatoka negra**, enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *Difformis*, se considera una de las enfermedades más difundidas en el cultivo de plátano, responsable de pérdidas de más del 50% en la producción a nivel mundial desde los años 60. Esta enfermedad afecta las hojas de las plantas y disminuye la capacidad fotosintética, reflejado de manera directa en los frutos que no logran alcanzar su peso ideal, además disminuye la vida verde de la fruta, con visibles reducciones en rendimiento (Rodríguez-Gaviria & Cayón, 2008).

Para su control se utilizan fungicidas, que deben ser aplicados en intervalos de 7-12 días aumentando los costos en la producción de 1.5 millones por hectárea a más de 6 millones, lo cual no es accesible a pequeños productores (Patiño, *et al.*, 2007; Gómez, 2007). No existe realmente un control biológico de la enfermedad, para su manejo se busca minimizar la propagación en el deshoje y quema de hojas afectadas (Gavilán, 2010).

Otra de las enfermedades más importantes en el cultivo de plátano es la **enfermedad del moko** cuyo agente causal es *Ralstonia solanacearum*. Esta enfermedad que puede causar hasta un 100% de pérdida en la producción (Tapiero & Rodríguez, 2007), es quizá la enfermedad bacteriana más importante en el cultivo de plátano en Colombia, debido a los altos costos que representa su control y la consecuente reducción en el área productiva del cultivo. Este patógeno produce marchitez en las hojas del plátano, afecta la producción de los frutos que no se desarrollan, o que maduran de forma prematura (Gavilán, 2010). La infección por *Ralstonia* se transmite a través de insectos y por herramientas usadas en la poda (Zapata, 2008).

El marchitamiento, una de las enfermedades más destructivas para este cultivo, de amplia distribución mundial, que junto a las anteriores enfermedades puede producir de un 30 a un 50% de pérdidas en la producción (Ayyadurai, *et al.*, 2006), no posee hasta el momento un control químico o cultural. Es causado por el patógeno *Fusarium oxysporum*, los síntomas se caracterizan por un amarillamiento de las hojas más viejas,

se puede presentar un agrietamiento en la base del pseudotallo, todas las hojas mueren y el pseudotallo adquiere una consistencia dura y seca. Para combatirla se utilizan genotipos resistentes al patógeno, proceso bastante tedioso, costoso, largo y al cual no tienen acceso todos los productores (Zambrano, *et al.*, 2007).

1.3.4 Alternativas al manejo fitosanitario y de fertilización en el cultivo de plátano

Con base en la problemática descrita anteriormente acerca de los costos de producción asociados a la utilización de fertilizantes químicos y control de enfermedades de los cultivos, es importante desarrollar alternativas que permitan disminuir el efecto nocivo residual que dejan los agroquímicos, mejorar el equilibrio biológico y la fertilidad del suelo. La restauración de los agro-ecosistemas perturbados por el uso de agroquímicos incluye hoy día el uso de microorganismos localmente adaptados (Ramírez, *et al.*, 2008) que abran la posibilidad de generar bioinsumos, que al aumentar la calidad y precio del producto mejoren la rentabilidad bruta del cultivo (Mejía *et al.*, 2009); dentro de esas alternativas encontramos los abonos orgánicos y los biofertilizantes incluidos los microorganismos eficientes.

- **Abonos orgánicos:**

La producción de **abonos orgánicos** generados a partir de la utilización de la **lombriz roja californiana**, ha proporcionado un mejoramiento en el cultivo de plátano traducido en un mayor anclaje en las plantas por la mayor producción de raíces, vigor de los colinos obtenidos, mejora en la calidad de suelos debido a la conservación de la humedad, mejor calidad de la fruta en cuanto a tamaño y peso y finalmente mayores beneficios económicos traducidos en un aumento de la calidad de vida de los productores (Cotes, 2010).

Otro de los abonos orgánicos más utilizados es el **Bokashi**, palabra de origen japonés que hace referencia a materia orgánica fermentada. El Bokashi es el producto final de la fermentación de residuos vegetales y estiércol mezclado con productos fermentadores como melaza y levaduras que aceleran la descomposición. Este abono orgánico es bastante usado por su bajo costo de producción, entre sus ventajas se cuentan la de mejorar la fertilidad ya que al ser muy rico en nutrientes es capaz de aumentar la biota del suelo, manteniendo un equilibrio natural de los microorganismos de la rizosfera, que permite mayor control de patógenos y una reducción de la utilización de agroquímicos y fertilizantes (Moreno, 2002).

- **Inoculantes biológicos o biofertilizantes:**

En cuanto al uso y aplicación de **inoculantes biológicos o biofertilizantes** en los sistemas productivos, se sabe que es una alternativa que permite una producción a bajo costo, contamina poco el medio ambiente y conserva el suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (ICA, 2004). Los inoculantes biológicos son productos elaborados a partir de una o varias cepas de microorganismos eficientes y/o benéficos de rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés), los cuales al aplicarse al suelo o directamente a las semillas, estimulan el crecimiento de la misma, al favorecer la disponibilidad, toma, transporte y adquisición de los nutrientes en

asociación con la planta o su rizósfera. Según el ICA, estos bioinóculos deben adaptarse a los cultivos y tener una concentración no menor a 1×10^5 UFC/ml (ICA, 2006). Los biofertilizantes se pueden aplicar en suelos en donde se ha reducido la diversidad y efectividad de los microorganismos o cuando, aunque existan microorganismos nativos estos no se asocien efectivamente con la especie de planta cultivada (Ramírez, *et al.*, 2008). De igual manera su importancia también radica no solo en los beneficios brindados a las plantas, sino también en su capacidad de unirse a partículas del suelo, que al formar agregados estables, mejoran la estructura del suelo y reduce la potencial erosión (Rivera- Cruz, *et al.*, 2008).

Hoy en día la producción de plátano orgánico es realizada en su mayoría por pequeños agricultores, por carecer de medios para aplicar las recomendaciones tecnológicas modernas. Los de mayor capacidad económica lo hacen porque han descubierto una oportunidad de hacer negocio, al mismo tiempo que se ajustan a las exigencias cada vez más fuertes de un sector consumidor que demanda mayor protección del ambiente, especialmente en lo que a uso de plaguicidas se refiere.

1.3.5 Uso de bacterias para estimular el crecimiento de plantas

Las comunidades microbianas del suelo son de vital importancia para el mantenimiento del balance ecológico del mismo y por lo tanto de la sostenibilidad de ambientes naturales o agroecosistemas. Estas comunidades microbianas se encuentran en su mayor parte en la rizósfera conocida como la interfase donde interactúan los constituyentes del suelo, las raíces de las plantas y los microorganismos ya sean saprófitos, epífitos, endófitos, patógenos o benéficos. Los microorganismos promotores de crecimiento de las plantas pueden ser considerados microorganismos benéficos ya que influyen la salud de la planta, estos efectos benéficos ya han sido reportados con anterioridad para diferentes cultivos como herbáceas, papa, frijol, soya, cítricos, banano, entre otros, todo eso debido a diversos mecanismos como la producción de fitohormonas, solubilidad de fosfatos, fijación de nitrógeno o control biológico sobre patógenos, las bacterias frecuentemente reportadas son cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter* y *Serratia*. Los beneficios que otorgan en la fase *ex vitro* también han sido descritos (Jaizme-Vega, *et al.*, 2003; Rivera-Cruz, *et al.*, 2008)

1.4 Objetivo general

Aislar, seleccionar e identificar microorganismos de los grupos actinomicetos, bacterias ácido lácticas y bacterias fotosintéticas no sulfurosas, con potencial biofertilizante, en suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana.

2. Capítulo 2: Microorganismos eficientes

El concepto de microorganismos eficientes o benéficos (EM por sus siglas en inglés) fue desarrollado por el profesor Teruo Higa en 1991 (Higa, 1991). Los EM son una mezcla de diferentes microorganismos tanto aerobios como anaerobios con más de 80 cepas, que representan cerca de 10 géneros diferentes y que poseen aproximadamente cerca de 100 millones de microorganismos activos/ml a un pH de 3,5. Estos microorganismos fisiológicamente compatibles y mutuamente complementarios, coexisten en equilibrio en un cultivo líquido y pueden ser aplicados como inoculantes para incrementar la diversidad microbiana de suelos y plantas (Zhou, *et al.*, 2009). Generalmente, los EM son una mezcla de hongos, actinomicetos, levaduras, bacterias ácido lácticas y fotosintéticas que se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza y que son capaces de interactuar entre sí (Woodward, 2003). Su potencial biofertilizante está dado por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar nutrientes insolubles como fosfato, descomponer residuos orgánicos, suprimir el crecimiento de patógenos del suelo, degradar tóxicos como pesticidas, reciclar e incrementar la disponibilidad de nutrientes y producir antibióticos y otras moléculas orgánicas simples como tocoferol, licopenos, saponinas, flavonoides y antioxidantes que estimulan el crecimiento de las plantas (Lwin & Ranamukhaarachchi, 2006; Higa, *et al.*, 1994; Mantilla, *et al.*, 2007; McMillan, 2007; Ramírez, *et al.*, 2008). Estos microorganismos son usados en la eliminación de problemas asociados con el uso de fertilizantes químicos y pesticidas y son ampliamente usados en agricultura orgánica (Higa, *et al.*, 1994).

Los EM, capaces de transformar un suelo que favorece las enfermedades, hacia uno supresor de enfermedades (zymogénico o sintético), son inoculados en la rizosfera con el objetivo de regenerar su equilibrio poblacional microbiano y crear un ambiente que promueva el crecimiento vegetal y la productividad en el cultivo. Para lograr este efecto estos microorganismos deben establecerse en el suelo y ser funcionalmente efectivos como grupo microbiano (Woodward, 2003).

Entre las ventajas de utilizar los EM tenemos, mayor resistencia generada a estrés, mejor mineralización del carbono y penetración de las raíces, descomposición gradual de agroquímicos en suelo, liberación más eficiente de nutrientes a partir de materia orgánica y aumento de la capacidad fotosintética de las plantas (Ramírez, *et al.*, 2008). Como se mencionaba anteriormente, los actinomicetos, las bacterias ácido lácticas y las bacterias fotosintéticas son parte de los microorganismos utilizados dentro de los inóculos comerciales de EM.

2.1 Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, aerobios heterótrofos principalmente, formadores de esporas y con alto contenido G+C (70 – 74%) en su DNA. El género principal es *Streptomyces* cuyo olor característico a tierra húmeda se debe a compuestos

volátiles como la geosmina. Especies de la familia *Streptomycetaceae* se encuentran extensamente distribuidas y estudiadas debido a la producción de metabolitos secundarios como enzimas inhibitorias extracelulares, herbicidas y antibióticos (Lezhava, *et al.*, 1995; Samac & Kinkel, 2001; Schlatter, *et al.*, 2009).

Estos microorganismos abundantes en suelo son importantes saprófitos de plantas, capaces de degradar moléculas complejas y sustancias recalcitrantes como celulosa, lignocelulosa, xilano y lignina, adicionalmente juegan un importante papel en el proceso de descomposición de material orgánico, debido a sus enzimas líticas (González-Franco, *et al.*, 2009; Sousa, *et al.*, 2008; Zhou, *et al.*, 2009). Los actinomicetos son capaces de producir sideróforos, pigmentos extracelulares de bajo peso molecular (500-1000 Da) fluorescentes o no, que puede solubilizar y quelar hierro del suelo e inhibir de esta forma el crecimiento de microorganismos patógenos (Caballero-Mellado, 2006), adicionalmente están implicados en la inducción de resistencia en diferentes sistemas planta – patógeno (Hernández, *et al.*, 2004).

Adicionalmente los actinomicetos son capaces de solubilizar fosfatos, cualidad muy importante ya que el fósforo se encuentra entre un 95-99% en forma de fosfato insoluble y no puede ser utilizado por las plantas (Pradhan & Sukla, 2005). La falta de fósforo es una de los principales limitantes en el crecimiento vegetal en producciones orgánicas (Pradhan & Sukla, 2005). Esta capacidad de los actinomicetos de convertir el fosfato insoluble en soluble se lleva a cabo a través de procesos de acidificación, quelación y reacciones de intercambio.

Los actinomicetos tienen un gran potencial como controladores de patógenos de plantas debido a la producción de antibióticos ionóforos (incrementan la captura de nutrientes incluyendo cationes) y enzimas que poseen actividad antimicrobiana. Dentro de las enzimas están la quitinasa que puede ser aprovechada como mecanismo de biocontrol especialmente de hongos patogénicos. Otras enzimas son la catalasa, amilasa y lipasa, las cuales son importantes en el proceso de crecimiento de plantas y el último grupo de enzimas son las celulasas y xilanasas, que actúan en la descomposición de materia orgánica y por tanto promueven el crecimiento de las plantas. De igual forma son capaces de colonizar el sistema de raíz de las plantas (Sousa, *et al.*, 2008). A los actinomicetos se les reconoce por su capacidad de sintetizar auxinas (reguladores de crecimiento vegetal), entre ellas el Ácido Indol Acético (AIA), promotor de crecimiento de raíces y de proliferación de pelos radicales que mejoran la absorción de agua y minerales del suelo, por lo tanto llevan a un mejor y mayor desarrollo de la planta (Caballero-Mellado, 2006).

2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son bacterias estrictamente fermentativas, crecen a un pH entre 4,8 y 9,6 y no forman esporas. Pueden ser bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles, catalasa y oxidasa negativos, anaerobias aerotolerantes.

Este tipo de bacterias promueve la fermentación de materia orgánica y descomponen materiales como lignina y celulosa (Zhou, *et al.*, 2009); poseen la capacidad de suprimir

microorganismos debido a la producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (antibacterianos), o sustancias parecidas a antibióticos como acidofilina, lactocidina producidas por *Lactobacillus acidophilus*, lactolina producida por *Lactobacillus plantarum* y nisina producida por *Streptococcus lactis*, (Visser, *et al.*, 1986). De igual manera las BAL son productores de nistatina (antifúngico) y de ácidos orgánicos como ácido acético, butírico, caprónico, propiónico, ácido 4-hidroxi-feniláctico y ácido-3-fenilacético reconocidos como antifúngicos (Lowe & Arendet, 2004; Ström, 2005; Mantilla, *et al.*, 2007; Yanagida, *et al.*, 2006; Alaniz, *et al.*, 2006). Estos microorganismos también son capaces de reducir poblaciones de nemátodos y controlar la propagación y diseminación de microorganismos patógenos como *Fusarium sp* (Ström, 2005; Laitila, *et al.*, 2002) *Pseudomonas sp.* (Cadirci & Citak, 2005) *Xantomona campestris* y *Erwinia caratovora* (Visser, *et al.*, 1986).

En poblaciones heterogéneas son capaces de disminuir la disponibilidad de nutrientes, al igual que el potencial de óxido-reducción lo cual podría representar también un antagonismo competitivo (Visser, *et al.*, 1986).

2.3 Bacterias fotosintéticas no sulfurosas (BFNS)

Las BFNS son proteobacterias, ampliamente distribuidas en la naturaleza, desde suelos y pantanos hasta aguas marinas y de desecho. Las BFNS son bacterias muy versátiles debido a su plasticidad metabólica, ya que pueden desarrollarse en condiciones anaeróbicas fotoautotrófica y fotoheterotróficamente, por medio de la reducción de compuestos inorgánicos u orgánicos, respectivamente. En aerobiosis son capaces de utilizar un amplio rango de compuestos como fuente de carbono y energía (Kim, *et al.*, 2004; Romero, 2006).

Este tipo de bacterias son pigmentadas debido a la producción de bacterioclorofila **a** o **b** y carotenoides, que les otorgan colores entre púrpura, rojo, café y naranja. Presentan subgrupos (alfa, beta y gama), las más estudiadas son las alfa proteobacterias. En el subgrupo de las alfa-1 encontramos a *Rhodospirillum* como su máximo representante; en alfa-2, *Rhodopseudomonas* y *Rhodomicrobium* y en el subgrupo alfa-3 *Rhodobacter* (Bryant & Frigaard, 2006). Las BFNS son capaces de fijar nitrógeno molecular (Cantera, *et al.*, 2004), formar ATP y producir vitaminas y otras moléculas orgánicas. También son capaces de almacenar poly-3-hidroxicanoatos (PHAs) siendo el más común el poli 3-hidroxi butirato (PHB) (Imhoff, 2006); Los PHAs son compuestos termoplásticos y biodegradables originados a partir de microorganismos, que se acumulan como reserva de carbono y energía en microorganismos que son sometidos a deficiencias nutricionales de elementos como nitrógeno, fósforo, sulfuro o magnesio ((a)Franco, 2009; Rozsa, *et al.*, 2004).

2.4 Objetivo específico

Aislar bacterias ácido lácticas, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y actinomicetos, a partir de la rizósfera de suelos asociados al cultivo de plátano en los municipios de Dibulla, Curumaní y María la Baja pertenecientes a la Costa Atlántica colombiana.

2.5 Metodología

Para dar cumplimiento a este objetivo, primero se definieron las zonas homogéneas y los sitios de muestreo en los tres municipios de interés, a través de la siguiente estrategia.

2.5.1 Definición de las zonas homogéneas y sitios de muestreo

Con base en el análisis de las variables clasificatorias de clima, suelo, geomorfología y características como el uso de la tierra, conflictos y las zonas agroecológicas (Banco de Imágenes del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) – Corpoica) se definieron las diferentes zonas geomorfológicas homogéneas (Kv, C, Cu, Cx, Cj, Cu y W), con la posterior generación de los mapas de muestreo correspondiente a cada uno de los municipios de interés, en donde se definieron las zonas para la toma de muestra.

2.5.2 Toma de muestras de los suelos para análisis físicoquímicos y microbiológicos en las zonas definidas

Para los análisis microbiológicos se tomaron 200 g de suelo rizosférico asociado a plátano, de 10 -15 cm de profundidad. Mientras que para el análisis químico se realizó una excavación a 30 cm de profundidad y se tomó, con una pala, una muestra compacta de aproximadamente 1 kg. La muestra de suelos en anillos (1 anillo por muestra) fue tomada para el análisis físico de los suelos (fotografía 2-1; fotografía 2-2).

Fotografía 2-1: Toma de muestra para análisis químicos. (A) Excavación a 30 cm para la toma de muestra (B) Muestra compacta de aproximadamente 1 kg.



Fotografía 2-2: Toma de muestra realizada para análisis físico del suelo. A. *Upland* para la toma de muestra B. *Upland* con la muestra de suelo.



2.5.3 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Para el aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizaron dos métodos:

- **Aislamiento directo**

A partir de las muestras de suelo rizosférico se realizaron diluciones seriadas hasta 10^6 ; las diluciones de 10^4 a 10^6 fueron sembradas por duplicado, con incubación a 37°C en condiciones de microaerofilia con Gaspak (ANAEROGEN) en jarras de anaerobiosis por un período de 48 h.

- **Aislamiento a partir de medios selectivos**

En este procedimiento 1 g de suelo rizosférico se adicionó a 90 ml de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe), se incubaron por 72 h a 37°C en condiciones aerobias. Cumplido este tiempo fue realizada una siembra en superficie de 10 μl del caldo MRS en agar MRS, las cajas fueron llevadas a incubación por 48 h a 37°C en aerobiosis (procedimiento realizado por duplicado). Para obtener aislamientos puros se realizaron pases sucesivos que fueron confirmados por coloración de Gram.

- **Prueba de catalasa**

A las colonias aisladas se les realizó la prueba de la catalasa y aquellas con resultado negativo se clasificaron como BAL.

2.5.4 Aislamiento de bacterias fotosintéticas no sulfurosas

Para el aislamiento de bacterias fotosintéticas no sulfurosas (BFNS) se utilizaron dos métodos

- **Aislamiento directo**

El procedimiento realizado fue igual que para BAL, excepto por el período de incubación de 7 días, a una temperatura de 30°C, con presencia de luz; el medio de enriquecimiento utilizado fue caldo *Rhodospirillaceae* (Biebl, *et al.*, 1982).

- **Aislamiento a partir de columna de Winogradsky**

El método propuesto por Tamer en 1989 (Yasa, *et al.*, 2006) fue el utilizado. La columna se dejó expuesta a la luz de 4 a 6 semanas, a partir de la zona con coloración naranja – café (fotografía 2-3), se realizaron diluciones de 10^1 hasta 10^3 por duplicado y fueron sembradas en tubos con 10 ml de agar semisólido a los que se les agregó parafina, la incubación se realizó a temperatura ambiente con exposición a la luz blanca directa por 3 semanas (Biebl, *et al.*, 1982).

Al cabo de este tiempo se tomó una asada del pool de colonias púrpuras, a partir de la cual se realizaron diluciones de 10^5 a 10^8 para el *roll tube*; de la dilución en que las colonias crecieron completamente aisladas, una de esas colonias se sembró en 15 ml de caldo de enriquecimiento dejando en incubación por 1 semana en las condiciones previamente mencionadas. A partir de este cultivo se procedió a aislar nuevas colonias en caja petri (incubación en jarras de anaerobiosis, a una temperatura de 30°C durante 8 días, con exposición a luz blanca directa).

Fotografía 2-3: Montaje de columna de Winogradsky donde se observa zona color naranja* luego de cuatro semanas de incubación.



2.5.5 Aislamiento de actinomicetos

El aislamiento de actinomicetos se realizó según lo descrito en el manual de Bergey's (2000). A partir de las muestras de suelo rizosférico fueron realizadas diluciones de 10^3 a 10^5 sembradas de forma masiva en agar avena suplementado con nistatina al 0.1% y agar Yeast Malt Extract (YEM); las colonias típicas de actinomicetos (polvulentas, arenosas, de diversos pigmentos) se pasaron a un nuevo agar avena, en donde para realizar la identificación microscópica colocando las laminillas estériles en un ángulo de 45° con respecto a la superficie del agar (fotografía 2-4). El tiempo de incubación fue 8 a

15 días a temperatura ambiente. Tanto la identificación de las características macroscópicas y microscópicas se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual de Bergey's (2000).

Fotografía 2-4: Montaje de láminas cubre objetos sobre el medio de cultivo agar avena para la recolección de muestras miceliales y análisis micorsocópicos.



2.5.6 Conservación de aislamientos

Para la conservación a bajas temperaturas de las BAL y las BFNS se tomó 1 ml de medio de cultivo y 1 ml de glicerol estéril al 40 % (concentración final 20%), los cuales se colocaron en crioviales estériles de 2 ml, posteriormente se homogenizaron con ayuda de un vórtex y se almacenaron a -20°C y a -80°C . Para el caso de los actinomicetos una vez sembrados y evidenciado el crecimiento y la pureza en agar YEM inclinado, se adicionó aceite mineral previamente esterilizado (conservación inmortal), adicionalmente un raspado de la superficie del micelio se adicionó a crioviales homogeneizándolo con glicerol al 20% para su posterior almacenamiento a -20°C ; protocolo modificado de Franco (2008).

2.6 Resultados y Discusión

Para los tres municipios muestreados Dibulla, Curumaní y María la Baja se definieron 9, 7 y 5 zonas geomorfológicas que se describen a continuación.

2.6.1 Descripción de la zona de estudio municipio de Dibulla

Por su situación en las estribaciones de la Sierra Nevada, el municipio de Dibulla posee diversidad climática que cambia con la altitud. La zona piloto se enmarca en alturas inferiores a los 1.000 m.s.n.m. y presentan temperaturas de 40°C en los valles de los ríos Palomino, Jerez y la Enea.

El Instituto Geografico "Agustín Codazzi", clasificó el sector dentro de la zona de vida Bosque Seco Tropical (BST). Presenta una topografía plana con algunas ondulaciones de poca importancia que no superan los 200 m.s.n.m. con buena vegetación que le sirve de cobertura vegetal, integrada por pastos y leguminosas, en menos proporción árboles y arbustos.

▪ Generación del mapa de muestreo

El mapa de muestreo correspondiente al municipio de Dibulla, definió 9 zonas geomorfológicas homogéneas: Kv, C, Cu, Cx, Cj, Cu, y W. El mapa generado se muestra en el anexo A. En la tabla 2-1 se definen los sitios de muestreo.

Tabla 2-1: Procedencia geográfica de las 9 muestras tomadas en el municipio de Dibulla, especificando la zona homogénea de procedencia.

Muestra	Zona homogénea	Finca	Latitud	Longitud	Altura m.s.n.m.
1	Cj	Sol y Sombra	N 11° 15' 36.4"	W 073° 17' 13,1"	19
2	Cu	La Loma del Suspiro	N 11° 16' 12.8"	W 073°18'04.6"	24
3	Cj	La Unión	N 11°15' 23.1"	W 073°18'21.7"	15
4	Cj	La Garavatera	N 11°15'25.0"	W 0.73°18'23.1'	15
5	Cj	Las Margaritas	N 11°15'20.1"	W 073°24'22.7"	13
6	Kv	La Ponderosa	N 11°11'44.6"	W 073°27'37.5"	108
7	W	La Malanga	N 11°13'50,8''	W 73°19'30,5''	No datos
8	Cx	Los Rosales	N 11°12'29,8''	W 73°27'00,8''	No datos
9	C	La Casa de Nina	N 11°16'28,9''	W 73°18'57,8''	No datos

2.6.2 Descripción de la zona de estudio municipio de Curumaní

El municipio de Curumaní se encuentra localizado sobre formaciones de la unidad geológica de la Serranía del Perijá y la llanura aluvial del piedemonte, en la zona de los valles de los ríos Cesar y Magdalena, donde la precipitación anual oscila entre 900 y 1,500 mm, con una temperatura promedio anual de 28°C, con una máxima de 39°C y una mínima de 22°C, dependiendo del régimen de lluvia anual. Esto permite clasificar la región dentro del piso térmico cálido ardiente, con alturas que van hasta los 2,400 m.s.n.m.

▪ Generación del mapa de muestreo

Seis zonas fueron definidas para el municipio de Curumaní por ser aptas para el cultivo de plátano: **Cj, Co, Cn, Cu, Kv y W**. El mapa generado se muestra en el anexo A. La zona **Mg** fue excluida puesto que sus altas pendientes y su relieve escarpado no permiten el establecimiento de este cultivo. Con base en las zonas homogéneas validadas se seleccionó un punto de muestreo para cada una de las siguientes zonas: **Co, Cn, Cu, Kv y W**, teniendo en cuenta su accesibilidad y la presencia del cultivo (tabla

2-2). Para la zona homogénea **Cj** se establecieron dos muestras geográficamente distribuidas debido a que es la zona que presenta mejores condiciones agrológicas para el cultivo y abarca un alto porcentaje del territorio del municipio. En la **zona homogénea Cu** definida por paisajes colinados y un relieve que varía de ondulado a quebrado y que presenta condiciones de ubicación acordes a la cartografía, se encontraron diferentes características físicas en sus límites a las indicadas en la información cartográfica. De esta manera, un punto muestreado en esta zona, se ubicó cartográficamente en la zona adyacente que no presenta las mismas condiciones físicas observadas en campo; no obstante, este punto muestreado se valida como punto perteneciente a la zona homogénea **Cu** por las condiciones físicas reales.

Tabla 2-2: Procedencia geográfica de las 7 muestras tomadas en el municipio de Curumani, especificando la zona homogénea de procedencia.

Muestra	Zona homogénea	Finca	Latitud	Longitud	Altura m.s.n.m.
1	Cj	Berlín	09°19'30,7" N	73°28'21,2" W	65
2	Co	Lote Z.U. Santa Isabel	9°20'6,1"N	73°29'12,5"W	62
3	Kv	Zona San Roque	09°17'40,6" N	73°30'12,4" W	60
4	W	Finca Vía Animito	09°19'23,8" N	73°31'13,1" W	56
5	Cj	Finca Cooprabiscur	09°12'49,9" N	73°31'35,6" W	68
6	Cu	Campan	09°11'39,0" N	73°38'49,0" W	66
7	Cn	Finca Alex Benjumea	09°12'34,8 N	73°37'48,3" W	37

2.6.3 Descripción de la zona de estudio municipio de María la Baja

El municipio de María La Baja está localizado en la Costa Caribe, al noroccidente del Departamento de Bolívar y hace parte de la zona de influencia del Canal del Dique. El municipio se levanta a 14 m.s.n.m. y es plano en un 90% con algunas elevaciones hacia el sur y el oriente sobre la serranía de San Jacinto en las estribaciones de los Montes de María. Estas elevaciones alcanzan unos 300 m.s.n.m. Predomina un clima cálido, generalmente seco, con temperaturas que oscilan entre los 26°C y 35°C. El municipio de María La Baja posee una altitud menor a 1,000 metros y cuenta con precipitaciones entre 1,000 y 2,000 mm anuales. Este territorio también fue clasificado por el Instituto Geografico "Agustín Codazzi", como zona de vida Bosque Seco Tropical (BST), donde las principales limitaciones para su uso son la escasa precipitación, sus pendientes y la susceptibilidad a la erosión.

▪ Generación del mapa de muestreo

El mapa de muestreo correspondiente al municipio de María la Baja define 5 zonas homogéneas: **Kv, C, Cn, Cx, Cj, Cu, y W**. El mapa generado se muestra en el anexo A.

La **Zona Cj** se tomó como la única a muestrear, debido a que es en esta donde se desarrollan cultivos de plátano y presenta las mejores condiciones para el establecimiento de la actividad agrícola. Esta zona ocupa el 35.12% del área del municipio, e incluye la vía principal sobre la cual se ubican la mayoría de los asentamientos poblados. De acuerdo a la zonificación realizada se concluye que el municipio tiene un 22.5% de su área en zonas inundables (**Zona W**) ubicadas al noroccidente de la cabecera municipal, que se corrobora en campo con la presencia de ciénagas debido a la influencia del Canal del Dique.

Otras zonas representativas dentro del municipio presentan pendientes entre el 12 y el 50%, cuyo relieve varía de ondulado a serranía, representando un 37.5% del área municipal (**Zona Cu** con un 17.8% y **Zona Kv** con un 19.7%) en la cual no se evidencia la presencia de cultivos de plátano, por lo tanto no se tomaron muestras de suelo de estas zonas.

Las demás zonas identificadas representan un bajo porcentaje del área del municipio así: **Zona C** ocupa el 1%, **Zona Cn** el 0.9% y **Zona Cx** el 2.7% del área municipal. Estas zonas no presentan características adecuadas para el establecimiento de cultivos de plátano y no resultan significativas para la actividad de muestreo.

Con base en las zonas homogéneas validadas se seleccionaron cinco puntos de muestreo en la **Zona Cj**, teniendo en cuenta su accesibilidad, la presencia del cultivo y su distribución geográfica (tabla 2-3).

Tabla 2-3: Procedencia geográfica de las 5 muestras tomadas en el municipio de María la Baja, especificando la zona homogénea de procedencia.

Muestra	Zona homogénea	Finca	Latitud	Longitud	Altura m.s.n.m.
1	Cj	Aproagrofor	10°00'41,1" N	75°15'55,9" W	26
2	Cj	La Campana	9°58'3,4"N	75°17'46,5"W	10
3	Cj	La Pechichona	09°56'9,3" N	75°22'13,2" W	9
4	Cj	La Enry	09°55'43,9" N	75°22'41,4" W	19
5	Cj	El Nazareno	09°53'48,2" N	75°21'39,9" W	26

2.6.4 Muestras de suelos en las zonas definidas

De los diferentes municipios se obtuvo un total de 21 muestras; 9 muestras en el municipio de Dibulla, correspondientes a las zonas homogéneas **Cu, Cj, Cx y W**; 7 muestras de suelo en el municipio de Curumaní correspondientes a la zona homogénea **W, Cu, Kv, Co, Cn y Cj** y 5 muestras de suelo de la zona **Cj** en el municipio de María la Baja.

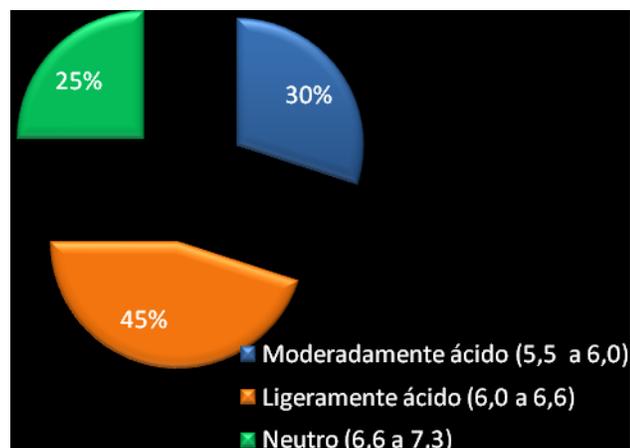
2.6.5 Análisis de las características físicoquímicas de las muestras

La calidad del suelo puede ser evaluada de acuerdo a las propiedades físicas, químicas y microbiológicas. Los resultados químicos y físicos de las muestras de suelos se presentan en el anexo B. Para la interpretación de los análisis de suelos, se usaron los niveles específicos de materia orgánica, fósforo y potasio, para el cultivo de banano y los generales para los demás elementos nutrientes (Rojas, *et al.*, 1992).

De acuerdo a los resultados se puede identificar el predominio de suelos franco-arenosos (9/20) sin embargo, también se reporta la presencia de suelos franco-arcillosos (5/20), franco-limosos (3/20), francos (2/20) y arenosos (1/20).

Con respecto al pH, los suelos oscilaron de moderadamente ácidos a neutros, con predominio de los suelos ligeramente ácidos, para cada uno de los municipios y sin presencia de acidez intercambiable; según lo propuesto por Rojas (1992) los suelos que presentan pH de moderadamente a ligeramente ácidos (75%) permiten disponibilidad general de todos los nutrientes; mientras que en los suelos que poseen pH neutro (25%) (figura 2-1) se comienza a restringir la disponibilidad de fósforo, debido a la formación de fosfatos de calcio o boratos de calcio de baja solubilidad; de igual forma el fósforo también puede unirse al hierro, el manganeso y el cobre que en formas oxidadas se precipitan y no se encuentran disponibles para el cultivo.

Figura 2-1: Distribución de pH en los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja.



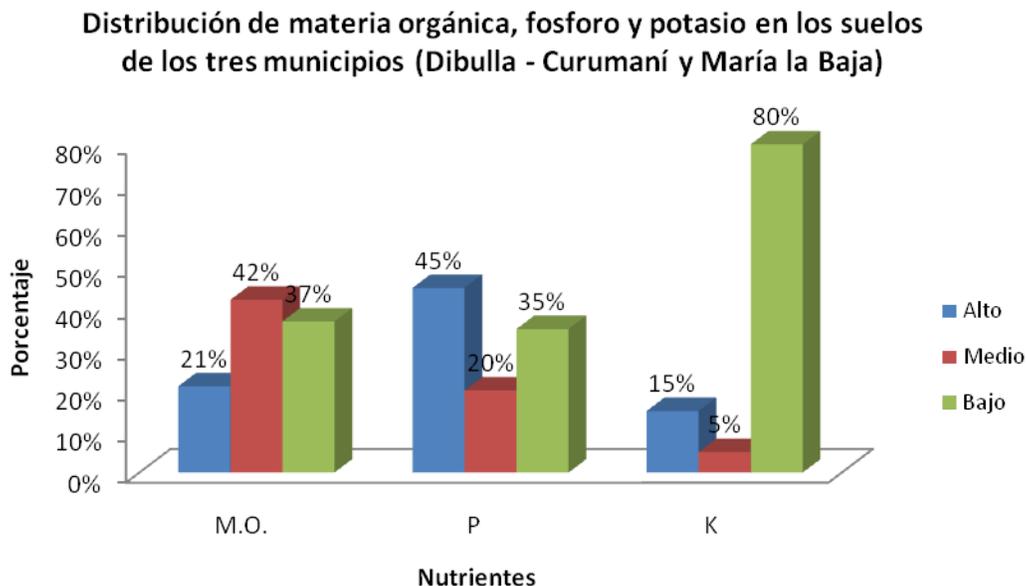
En los suelos muestreados el 79% presentó porcentajes de materia orgánica de moderados a bajos, lo que indica una posible respuesta a fertilización nitrogenada; El 21% de suelos restante presentó altos porcentajes de materia orgánica (representados en 3 suelos de María la Baja y 1 suelo de Dibulla), es así que en estos suelos se esperaría una baja respuesta a la fertilización con nitrógeno. La materia orgánica es el más importante de los parámetros que describen la calidad del suelo debido a que indica la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y azufre, al igual que otros micronutrientes (Chen, *et al.*, 2003).

Con respecto al fósforo su disponibilidad está restringida por el pH, por lo que en los municipios de Dibulla y María la Baja donde se presentaron suelos con alto contenido de fósforo, pero con pH neutro, se esperaría la formación de fosfatos de calcio (de baja

solubilidad) y por lo tanto una baja respuesta a la fertilización con dicho elemento. Para el municipio de Curumaní el panorama con dos de los suelos muestreados es el mismo que para los dos municipios anteriores sin embargo, de acuerdo a los resultados químicos se esperaría respuesta a la aplicación de fósforo en el cultivo de plátano, debido a los contenidos de bajos a moderados (55%) de fósforo y a la restricción por pH.

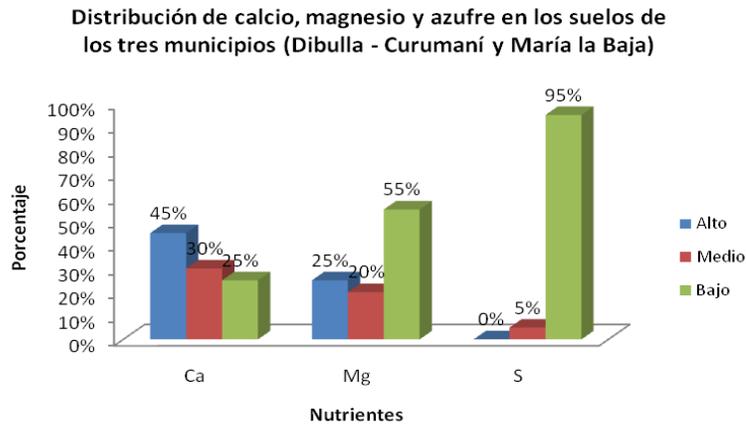
En general los suelos muestreados presentaron bajos contenidos de potasio (80%) (figura 2-2) y se esperaría una alta respuesta a la fertilización con este elemento, más aún si se tiene en cuenta la necesidad del mismo en el cultivo de plátano ya que cataliza procesos importantes como la respiración, la fotosíntesis, la formación de clorofila y regulación del contenido de agua en la hojas; así mismo está ligado al transporte y acumulación de azúcares dentro de la planta lo que permite el llenado de la fruta (IPNI, 2010). Al contrario, 45% de los suelos presentaron altos contenidos de calcio (figura 2-3) asociados a bajos contenidos de magnesio y potasio, lo que ocasiona un desbalance y por ende baja disponibilidad para las plantas. Es de suma importancia el hecho de que son los suelos de María la Baja aquellos que presentan altos contenidos tanto de calcio, magnesio y potasio y probablemente esto significa que la respuesta a la fertilización con dicho elementos se encuentra disminuida.

Figura 2-2: Distribución de materia orgánica (alto>3, medio 2 a 3, bajo<2), fósforo (alto>30, medio 15 a 30, bajo <15) y potasio (alto>0,6 medio 0,3 a 0,6 bajo<0,3) en suelos de Dibulla, Curumani y María la Baja.



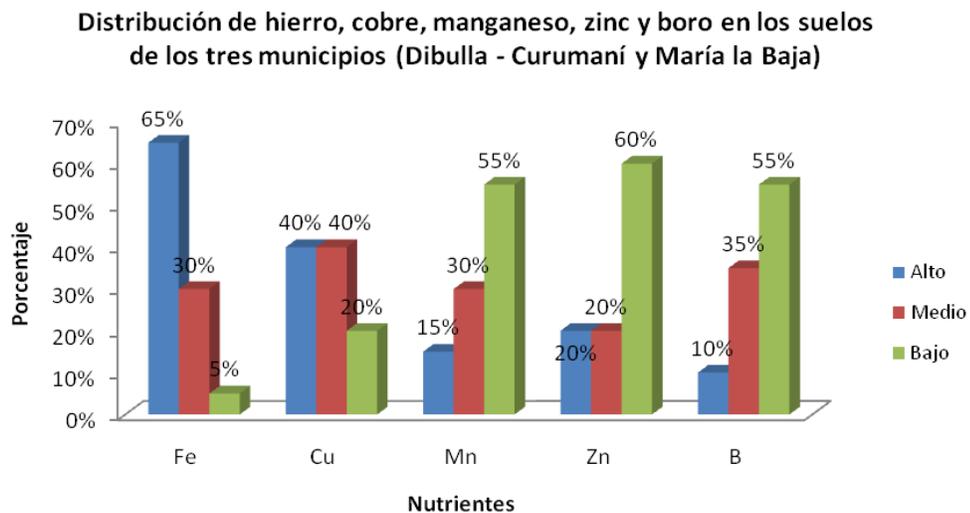
En el caso del magnesio donde 75% de los suelos presentaron niveles edáficos de bajos a moderados y debido a su desbalance frente al calcio, se esperaría una alta respuesta a la fertilización con este elemento, lo mismo sucedería para el azufre debido a que los suelos de los tres municipios presentan bajo contenido de este elemento.

Figura 2-3: Distribución de los elementos secundarios calcio (alto>6, medio 3 a 6, bajo<3), magnesio (alto>2,5, medio 1,5 a 2,5, bajo<1,5) y azufre (alto>20, medio 10 a 20, bajo<10).



En el caso de micronutrientes como el hierro, donde los suelos muestreados presentan un bajo contenido se esperaría una alta respuesta a la fertilización con dicho elemento sin embargo, se debe tener cuidado, puesto que en el 5% de los suelos este elemento se encuentra asociado a pHs neutros, que pueden favorecer la formación de óxidos que se precipitan y por tanto son de baja disponibilidad para las plantas. Con respecto al manganeso, zinc y boro, la mayoría de los suelos (55%, 60% y 55% respectivamente) presentarían una alta respuesta a la fertilización debido a su baja concentración. Para el caso del cobre 80% de los suelos presentan contenidos de moderados a bajos, de dicho elemento (figura 2-4).

Figura 2-4: Distribución de los elementos secundarios hierro (alto>50, medio 50 a 25, bajo<3), cobre (alto>3, medio 1 a 3, bajo<1), manganeso (alto>10, medio 10 a 5, bajo<5), zinc (alto>3, medio 3 a 1,5, bajo<1,5) y boro (alto>0,4, medio 0,4 a 0,2, bajo<0,2).



2.6.6 Análisis microbiológicos de las muestras colectadas

Los microorganismos, al igual que otros organismos vivos de diferentes géneros y especies son considerados habitantes naturales del suelo. Su abundancia, actividad y clase, depende del contenido de materia orgánica, textura del suelo, pH, temperatura, aireación, entre otros factores. Dentro de los microorganismos del suelo se sabe que las bacterias son las más abundantes con cerca de $10^8 - 10^9$ UFC/g de suelo, los actinomicetos se encuentran ubicados en el segundo lugar $10^7 - 10^8$ UFC/g de suelo, seguidos por los hongos y las algas con $10^5 - 10^6$ y $10^4 - 10^5$ UFC/g de suelo. En la rizosfera el estrés bacteriano, es el responsable de la amplia variedad de grupos bacterianos fisiológicamente diferentes, debido a su capacidad de adaptarse a las condiciones medio ambientales ofrecidas (Buée, *et al.*, 2009; Rico, 2009). Adicionalmente la actividad microbiana es un indicador de la calidad del suelo, así como también puede predecir cambios en las propiedades del mismo (Chen, *et al.*, 2003).

▪ Recuento de bacterias totales y hongos filamentosos

Los resultados de los recuentos de los diferentes grupos bacterianos evaluados indican que los suelos muestreados para este estudio presentaron poblaciones microbianas en concentraciones similares a las reportadas por la bibliografía en suelos agrícolas; en el caso de las bacterias totales del suelo todas las muestras presentaron concentración de 10^7 UFC/g de suelo, similar a las concentraciones reportadas por Foster (1988) y Zou (2000) en los suelos recolectados de las estaciones experimentales de Laoshan y Maershan, en la provincia de Heilongjiang - China. Sin embargo, los recuentos obtenidos para hongos filamentosos se encuentran en concentración de 10^6 UFC/g de suelo, un poco más altas que las reportadas por Chen (2003). En la tabla 2-4 y la tabla 2-5 se presentan los resultados del recuento de bacterias totales y hongos filamentosos para el municipio de Dibulla.

La presencia de estas comunidades bacterianas y fúngicas puede ser influenciada por la disponibilidad de nutrientes, la calidad del suelo y la presencia o ausencia de agua, lo que permite que fluctúe en el tiempo la diversidad de estas poblaciones. No obstante no se tiene mucha información con respecto a otros factores como el pH y la disponibilidad de otros nutrientes incluido el oxígeno y de otros micronutrientes incluidos en el análisis químico de los suelos (Buée, *et al.*, 2009; Daniel, 2005).

Se cree que estos suelos de vocación agrícola donde la fertilización es de tipo orgánica, podría favorecer la presencia de ciertos grupos microbianos; a pesar de conocer la concentración de bacterias y hongos totales en los suelos estudiados, solo se determinó la presencia de los grupos de interés para el estudio, pertenecientes a los *phylum* *Proteobacterias*, *Actinobacterias* y *Firmicutes*, *phyla* que se determinan con mayor frecuencia en suelos con análisis metagenómicos (Daniel, 2005; Roesch, *et al.*, 2007).

Tabla 2-4: Recuento de bacterias totales de las primeras seis muestras de suelo del municipio de Dibulla para las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 y un promedio de las mismas.

Muestra	Dilución 10^4		Dilución 10^5		Dilución 10^6		UFC/g de suelo
M1	>300	>300	10	17	6	7	7×10^7
M2	>300	>300	163	165	6	7	7×10^7
M3	>300	>300	>300	>300	12	8	10×10^7
M4	>300	>300	81	82	18	18	18×10^7
M5	>300	>300	>300	>300	8	1	4×10^7
M6	>300	>300	>300	>300	8	8	8×10^7

Tabla 2-5: Recuento de hongos filamentosos totales de las primeras seis muestras de suelo del municipio de Dibulla para las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 y un promedio de las mismas.

Muestra	Dilución 10^4		Dilución 10^5			Dilución 10^6			UFC/g de suelo
M1	>300	>300	55	47	45	2	3	1	49×10^6
M2	>300	>300	13	22	15	3	5	3	17×10^6
M3	>300	>300	11	18	19	5	7	0	16×10^6
M4	>300	>300	22	24	20	6	0	0	22×10^6
M5	>300	>300	40	44	40	2	2	3	41×10^6
M6	>300	>300	35	18	5	5	5	5	19×10^6

2.6.7 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son reconocidas por su destacado rol en la tecnología de los alimentos sin embargo, en la década del 90 se reconoce su papel en el suelo (Martín, 2008). Se encuentra una amplia variedad de BAL debido a sus características fisiológicas y bioquímicas; en cuanto a su morfología se incluyen, cocos, bacilos y cocobacilos, recuperados de productos lácteos, cárnicos, alimentos fermentados y suelos (Martín, 2008; Abdelbasset, 2008). Los estudios de aislamientos de BAL a partir de suelos no son muy numerosos, debido a que las BAL requieren de medios ricos en nutrientes sin embargo, algunos autores reportan la presencia de BAL formadoras de esporas en suelo (Estrada, *et al.*, 2005; Yanagida, *et al.*, 2005; Yanagida, *et al.*, 2006). Su importancia en el suelo radica en la capacidad antagónica ya que son capaces de producir sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, antibióticos u otros metabolitos, lo que sugiere que pueden ser utilizadas para el control biológico de enfermedades causadas por otros microorganismos en las plantas (Visser, *et al.*, 1986).

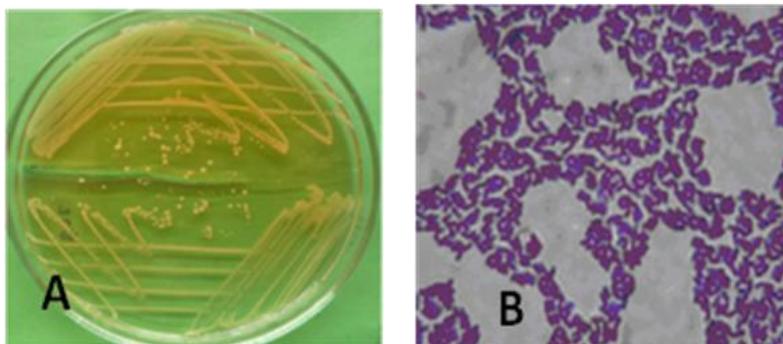
▪ Aislamiento directo

La siembra directa con las diluciones de 10^4 a 10^6 no presentó ningún tipo de crecimiento en el medio utilizado; posteriormente se probaron las diluciones de 10^1 a 10^3 , en las cuales el 80% de las colonias fueron catalogadas como catalasa positiva y solo un 20% como catalasa negativa; esto puede ser debido a que este tipo de microorganismos se encuentran en baja proporción en la muestra y por lo tanto se hace necesario recurrir a métodos más selectivos.

▪ Aislamiento a partir de medio de enriquecimiento selectivo

A partir de este método, se logró obtener un total de 78 BAL, catalasa negativa, su morfología fue corroborada mediante tinción de Gram. Un total de 15 cepas fueron seleccionadas como presuntivos *Lactobacillus* (bacilos Gram positivos, catalasa negativos (fotografía 2-5; anexo C), 9 (60%) pertenecientes al municipio de Dibulla, 5 (33.3%) a Curumaní y 1 (6.6%) del municipio de María la Baja. El 66.6% de los aislados correspondieron a la zona Cj (apta para el cultivo de plátano), caracterizada por ser de zona cálida de paisaje de planicie aluvial, con un relieve plano, una altitud de 0 a 1000 m.s.n.m. y una precipitación de 1000 a 2,000 mm. El municipio de Dibulla presentó la mayor cantidad de BAL aisladas, a la vez el pH, es ligeramente más ácido. Esto podría estar relacionado con la misma presencia de bacterias acidófilas unidas a otros grupos bacterianos que posean la misma capacidad. Otro dato que reviste gran importancia es que en el municipio de Dibulla fue donde se tomaron más muestras de suelo, lo cual podría influenciar también el mayor número de aislados resultantes.

Fotografía 2-5: A. Cultivo de bacterias ácido lácticas en agar MRS. B. Coloración de Gram, se observan bacilos Gram positivos



2.6.8 Aislamiento de bacterias fotosintéticas no sulfurosas

Las bacterias púrpuras fototróficas son las bacterias anoxifotótrofas más diversas filogenéticamente hablando, con miembros en las subclases α , β y δ de las proteobacterias y contienen bacterioclorofila *a* o *b*. Estos microorganismos que ofrecen carbono fijado a otros microorganismos quimiotróficos, también son capaces de producir hidrógeno. Debido a su capacidad de fijar de nitrógeno son capaces de contribuir a la

fertilidad del ecosistema donde residen. Son microorganismos con una amplia versatilidad metabólica, que pueden crecer con presencia o ausencia de luz; adicionalmente presentan habilidades de degradación de materia orgánica altamente desarrolladas (Achenbach, *et al.*, 2001; Ludden & Roberts, 2002; Cantera, *et al.*, 2004; Oda, *et al.*, 2008).

- **Aislamiento directo**

Este procedimiento no resultó efectivo ya que no hubo ningún tipo de crecimiento durante el periodo de incubación (cuatro semanas).

- **Aislamiento a partir de columna de Winogradsky**

Como resultado de este procedimiento, se logró estimular el crecimiento de los diferentes grupos microbianos presentes, el cual se refleja en la presencia de diferentes tonalidades en la columna después de 3 a 5 semanas de incubación (fotografía 2-6). La adición de una fuente de celulosa económica (papel kraft, celulosa cruda, altamente resistente) permitió la promoción de un rápido crecimiento microbiano, ya que en su degradación se producen ácidos y alcoholes, fuentes de carbono para bacterias sulfato reductoras presentes en la parte inferior de la columna, estimulando la producción de CO₂ y reduciendo la concentración de oxígeno en el agua permitiendo que se desarrollen diferentes poblaciones en la misma (Yasa, *et al.*, 2006).

La capa superficial encontrada en la columna sugiere que hubo crecimiento de microorganismos aerobios fotosintéticos como las cianobacterias (tonalidades verdes en la parte superior); Igualmente se evidenció una tonalidad de color rojo-naranja (en la zona microaerofílica), resultado que sugiere la presencia de bacterias fotosintéticas no sulfurosas (fotografía 2-6).

Fotografía 2-6: Columna de Winogradsky, donde se observa la franja color naranja (zona microaerofílica) que sugiere la presencia de bacterias fotosintéticas no sulfurosas.



Otro de los grupos bacterianos que se presentaron en la columna, fueron las bacterias rojas y verdes del azufre. En la parte inferior a la interfase lodo-agua se formaron precipitados de color oscuro, sugiriendo la presencia de sulfatos que al unirse a metales como hierro, cadmio, cobalto, níquel y zinc toman la coloración mencionada anteriormente y sugieren la presencia de bacterias sulfato reductoras en un ambiente anoxigénico. Dentro de este grupo de bacterias se reporta en la literatura la presencia de

Desulfobacter, Desulfobulbus, Desulfococcus, Desulfosarcina y Desulfovibrio (Yasa, et al., 2006).

A la tercera semana de incubación y luego de muestreada la columna se observó crecimiento de las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas en las diluciones 10^1 y 10^2 , también se observó la precipitación de sales de hierro (color negruzco disperso en toda la extensión del tubo) producto del crecimiento de bacterias sulfato reductoras, por tal razón se escogió la dilución 10^3 para el aislamiento de las BFNS (fotografía 2-7). A partir de esta dilución se realizó una coloración de Gram para observar el tipo de morfología presente y se comparó con la morfología reportada por Trüpper y Pfennig (2006), se encontraron bacilos rectos Gram negativos característicos de *Rhodopseudomonas* (fotografía 2-7).

Fotografía 2-7: A. Crecimiento de BFNS sembrados con la dilución 10^2 a partir de una columna de Winogradsky. B. Coloración de Gram a partir del cultivo de BFNS, aumento 1000 X.



Un total de 61 colonias de BFNS fueron transferidas a caldo de cultivo, de las cuales se lograron recuperar y purificar 28 aislamientos (anexo C). Para la identificación fenotípica se observó la coloración de las colonias de BFNS que varía de rojo a rosado pálido (fotografía 2-8). Se realizó lectura a diferentes longitudes de onda del medio líquido donde crecieron las BFNS, con el fin de identificar el tipo de bacterioclorofila, revelando un pico único de absorción a 850 - 910 nm, similar a lo encontrado para BFNS por Oda (2008). Esta observación sugiere la presencia de bacterioclorofila *a* (Trüpper & Pfennig, 2002). De las 28 BFNS, 7 (25%) pertenecían al municipio de Dibulla, 16 (57.1%) al municipio de Curumaní y 5 (17.9%) restantes corresponden al municipio de María la Baja.

Al igual que para las BAL el mayor porcentaje de bacterias fueron aisladas de la zona Cj, descrita anteriormente. Una posible explicación a que el municipio de Curumaní haya aportado el mayor número de aislados de BFNS es quizá la diferencia en cuanto a las características del suelo mismo, donde su pH tiende a ser de moderadamente ácido a ligeramente ácido, que favorece el crecimiento tanto de *Rhodopseudomonas* como de

Rhodomicrobium (Trüpper & Pfennig, 2002). En estos suelos el pH, el hierro y el magnesio también son de gran importancia para el crecimiento de bacterias purpuras (Stanier, *et al.*, 2006), es así que en las muestras de donde se aislaron los microorganismos pertenecientes a Curumaní la presencia de hierro tiende a ser de moderada a alta lo que favorece la presencia de las bacterias sin embargo, la concentración del magnesio es baja en comparación con los otros municipios, pero parece ser suficiente para el adecuado crecimiento de las bacterias.

Fotografía 2-8: Aislamiento de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas en agar *Rhodopseudomonas Medium*.



2.6.9 Aislamiento de actinomicetos

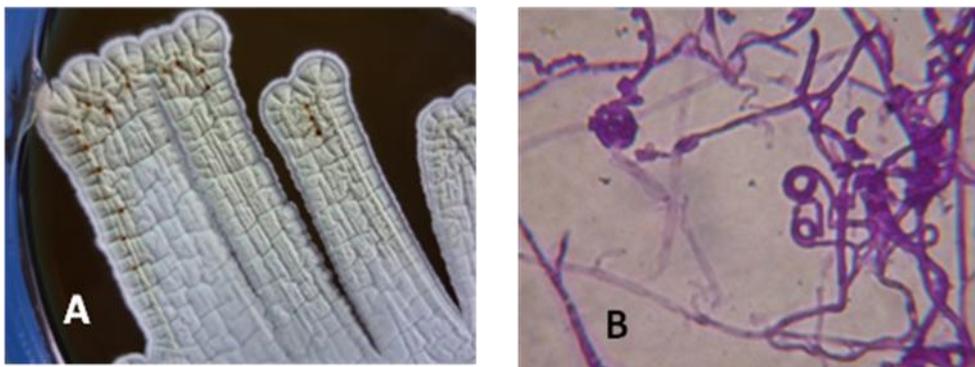
Los actinomicetos, uno de los grupos más abundantes en el suelo, poseen una amplia diversidad metabólica que le permite participar en importantes procesos como la remoción de metales, degradación de agroquímicos, fijación de nitrógeno, control biológico de patógenos de plantas y animales por la producción de antibióticos, enzimas y productos bioactivos; así como también les permiten participar en actividades biodegradativas por su diversidad enzimática para metabolizar moléculas recalcitrantes.

Todas estas actividades hacen que los actinomicetos desempeñen un papel fundamental en la sostenibilidad a largo plazo de sistemas naturales y agrícolas y sean catalogados como indicadores de fertilidad de los suelos (Cardona, *et al.*, 2009; Oskay, *et al.*, 2004; Franco, 2009; Schlatter, *et al.*, 2009; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

- **Aislamiento directo**

Una vez finalizado el tiempo de incubación, las colonias de actinomicetos (fotografía 2-9) fueron identificadas presuntivamente teniendo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas. Microscópicamente se registró el tipo de micelio (vegetativo o aéreo), la coloración de Gram confirmó que los aislamientos eran Gram positivos, con presencia de filamentos delgados, ramificados, largos o cortos en forma de espiral. Para la caracterización macroscópica se tomaron en cuenta la coloración del micelio aéreo y del sustrato, pigmento melanoide y pigmento difusible en el medio (anexo D).

Fotografía 2-9: A. Aislamiento de actinomicetos sobre agar avena suplementado con nistatina mostrando la producción de metabolitos. B. Fotografía de microscopía de actinomiceto donde se observa su estructura en espiral.



En este estudio se aislaron 93 actinomicetos en total sin embargo, luego de una pre-clasificación por microscopía, fueron escogidos solo aquellos que presentaran hifas en formas de espiral características de *Streptomyces*, 33 cepas fueron seleccionadas (anexo C). Diez (30,3%) pertenecen al municipio de Dibulla, 20 (60,6%) al municipio de Curumaní y 3 (9,1%) restantes corresponden al municipio de María la Baja. Al igual que para los dos grupos anteriores el mayor porcentaje de bacterias fueron aisladas de la zona Cj, descrita anteriormente. El mayor número de actinomicetos aislados provienen del municipio de Curumaní.

Tres de los factores que controlan la abundancia de actinomicetos especialmente *Streptomyces*, son los valores de materia orgánica, pH y salinidad (El-Tarabily & Sivassithamparam, 2006). Estos microorganismos prefieren suelos neutros, similares a los de Curumaní que a pesar de ser ligeramente ácidos tienden hacia la neutralidad. De igual forma prefieren suelos con alto contenido de materia orgánica, en los suelos de Curumaní se presentaron niveles de adecuados a altos de materia orgánica lo que favorece la presencia de los mismos en este municipio.

2.6.10 Identificación de los aislamientos en estudio

Los aislamientos microbiales obtenidos fueron codificados según el municipio de procedencia y el tipo de microorganismo aislado, las siglas con las cuales fueron codificadas las cepas fueron: Dibulla (D), Curumaní (C), María la Baja (B), Actinomiceto (A), Bacteria Ácido Láctica (B), Bacteria Fotosintética No Sulfurosa (F). Las cepas poseen una identificación dependiendo el tipo de microorganismo y el municipio de procedencia, es así que el número 24DB, corresponde al aislamiento número 24 de bacterias ácido lácticas provenientes del municipio de Dibulla.

3. Capítulo 3: Propiedades de microorganismos eficientes como bacterias promotoras de crecimiento

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) son capaces de colonizar la raíz y estimular el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos como: capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfatos, producir sideróforos y ser reguladores de crecimiento vegetal, además de poseer capacidad antagónica por diversos mecanismos (Kloepper *et al.*, 1989). Algunas de estas características fisiológicas se describen a continuación.

3.1 Producción de indoles totales

Se cree que las auxinas son importantes en la interacción planta-patógeno, sin embargo son ampliamente conocidas como reguladoras del crecimiento de las plantas (Vassilev, *et al.*, 2006). Los géneros bacterianos productores de auxinas más estudiados son *Bacillus sp.*, *Azospirillum sp.*, *Pseudomonas sp.* y actinomicetos, dentro de estos los *Streptomyces sp* (Sousa, *et al.*, 2008; Bloemberg, 2001; Carcaño-Montiel, 2006; Hernández, 2004;)

Se sabe que las auxinas estimulan la producción de etileno en diversos tejidos; aumentan el tamaño de los frutos al estimular el crecimiento de las células, actuando sobre la elongación y división celular, importante en el crecimiento de órganos y frutos.

Existen 3 grupos auxínicos:

- Derivados del indol como ácido indolil propiónico (IPA), ácido indolil butírico y el ácido 3 indolil acético (AIA)
- Derivados del naftaleno, como ácido naftalen acético (NAA), ácido naftoxiacético (Noxa o BNOA) y ácido naftilpropiónico (NPA).
- Derivados fenoxi, usados como herbicidas selectivos y algunas veces como reguladores del crecimiento vegetal.

El Ácido Indolil Acético (AIA) que tiene una estructura química similar a la del aminoácido triptófano, es quizá una de las auxinas más conocidas, capaz de producir raíces adventicias, alargar raíces primarias (Castellanos, *et al.*, 2009), así como controlar tropismos como giros o curvaturas en los tallos sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de su expresión metabolismo, transporte y distribución final.

Debido a su similaridad con el triptófano, se han realizado estudios gracias a los cuales, hoy en día se conocen 4 vías de formación de esta auxina a partir de un intermediario distinto cada uno. En las bacterias el AIA se produce a partir del triptófano a través de la vía Indolil-Acetamida (IAM), aunque existe una vía alternativa utilizando el ácido 3-indolil pirúvico (IPvA) (Celis & Gallardo, 2008).

La vía del Indolil-Acetamida (IAM) en bacterias es la más estudiada, presenta dos etapas, en la primera por acción de triptófano 2-monooxigenasa se convierte el triptófano a IAM, mientras que en la segunda etapa la IAM es convertida a AIA por la IAM hidrolasa. La otra vía caracterizada es la del Indolil 3-piruvato (IPvA); consta de tres fases, en la primera por medio de una aminotransferasa se convierte triptófano a IPvA, el cual es posteriormente descarboxilado a indolil 3-acetaldehído por la indol 3-piruvato descarboxilasa, por último el indolil 3-acetaldehído es oxidado y convertido a ácido 3-indolil acético (Celis & Gallardo, 2008).

Los actinomicetos han sido ampliamente reportados por su capacidad de producir reguladores de crecimiento de las plantas del tipo auxinas (El-Tarabily, *et al.*, 2006; Hamdali, *et al.*, 2008; Sousa, *et al.*, 2008)

3.2 Antagonismo

El control biológico se considera como una alternativa importante en el manejo integrado de enfermedades dentro de un cultivo. El rol de la antibiosis en el control biológico ha sido reportado tanto en bacterias ácido lácticas como en los actinomicetos; se sabe que en una población heterogénea la disminución del potencial de óxido-reducción así como de los nutrientes podrían causar un antagonismo competitivo (Visser, *et al.*, 1986), adicionalmente este antagonismo se debe también a diversos metabolitos producidos por las bacterias.

Desde 1944 cuando se anunció la producción de estreptomina producida por los *Streptomyces*, estos microorganismos han sido el centro de atención de la industria farmacéutica debido a que gran número de antibióticos (70%) son producidos por esta especie de actinomicetos, los cuales también son capaces de producir novobiocina, ciclohexamida entre otros antibióticos (Rabbani, *et al.*, 2007). En el 2001 Castillo-Fabela reportó la capacidad de inhibición de algunos actinomicetos aislados de rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani*, con porcentajes de inhibición entre el 72.4 y 68.8% sin embargo, en México existen cepas como el *Streptomyces griseoviridis* comercialmente conocida como "Mycostop" usada para el control de *Fusarium sp.* en clavel (Castillo-Fabela, *et al.*, 2001).

Las bacterias ácido lácticas son de gran importancia en la inhibición de microorganismos patógenos debido a la producción de metabolitos antimicrobianos como el ácido láctico y ácido acético que causan reducción en el pH, otros metabolitos como el peróxido de hidrógeno destruyen la actividad enzimática bacteriana; mientras que sustancias como las bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) son potentes bactericidas, sintetizados ribosomalmente y son activos contra otras bacterias ya sea de la misma especie o de

otros géneros, es así que bacteriocinas de BAL puede inhibir otras BAL por competencia por el mismo nicho ecológico (Knoll, 2007).

Existen tres tipos de bacteriocinas, I, II y III; las de tipo II que se sabe son producidas por *L. plantarum*, necesitan para su producción y exportación genes estructurales, transportadores del tipo ABC y sufrir ciertas modificaciones. Los genes de bacteriocinas vienen codificados en su gran mayoría en plásmidos sin embargo, también pueden ser localizados en el cromosoma o incluso en transposones. Los *clusters* de genes vienen arreglados en uno o varios operones, donde un operón es estructural, otro lleva genes que codifican para el procesamiento, transporte y secreción y un tercer operón lleva genes involucrados en la regulación de la producción de la bacteriocina, importante en la fabricación de bacteriocinas a nivel industrial (Knoll, 2007).

Algunos estudios demuestran que los *Lactobacillus* tienen actividad inhibitoria sobre *E. coli*, algunas especies de *Pseudomonas*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhimurium*. (Cadirci & Citak, 2005; Estrada, *et al.*, 2005)

3.3 Degradación de celulosa, xilano y quitina

- **Celulosa:** Debido a que gran parte de la vegetación que pasa a formar parte del suelo es celulósica, la descomposición de este carbohidrato tiene una importancia muy especial en el ciclo biológico del carbono (Gutierrez, *et al.*, 2008), por lo tanto los microorganismos del suelo que catabolizan la hidrólisis del material vegetal favorecen el flujo de energía hasta la posterior formación de CO₂ y su liberación a la atmosfera (Hendricks, *et al.*, 1995). Esta hidrólisis es llevada a cabo por tres enzimas (i) la endo β -1,4 glucanasa (β -1,4 glucano glucanohidrolasa), (ii) la exo β -1,4 celobiohidrolasa y (iii) la β -1,4 glucosidasa (Zhang, *et al.*, 2006). Tanto las bacterias como los hongos son capaces de degradar este material, la variación en el número de estos microorganismos en el suelo, sugieren modificaciones en la materia orgánica del mismo, por lo tanto conocer la biomasa, diversidad de especies y su capacidad para degradar este carbohidrato generan información sobre el estado del suelo y su productividad (Gaitan & Perez, 2007).
- **Xilano:** Es un heteropolisacárido cuya degradación es llevada a cabo por un grupo de enzimas como la endo- β -D-xilanasas, las cuales rompen enlaces glicosídicos al azar; la arabinofuranosidasa hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, mientras que las acetilxilanesterasas liberan grupos acetatos. La glucoronidasa remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico a partir de unidades de xilosa. Las β -xilosidasas son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β -1,4-aril-xilopiranósido produciendo xilosa (Ponce & Pérez, 2002).
- **Quitina:** Es un homopolímero insoluble, formado por residuos de N-acetil-D-glucosamina unida por enlaces β -1,4. Su estructura es similar a la de la celulosa exceptuando el grupo hidroxilo (-OH), presente en el carbono dos de la celulosa. Este polímero se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como un componente estructural de hongos, insectos, crustáceos y protozoos (Mukherjee & Sen, 2007).

El proceso biológico de la degradación de quitina, es llevado a cabo mediante la acción de quitinasas que hidrolizan el enlace glicosídico β -1,4; estas enzimas hacen parte del sistema quitinolítico junto a las quitobiosas, enzimas de acción sinérgica y consecutivas, presentes en *Streptomyces*. Muchos *Streptomyces* pueden utilizar la quitina como única fuente de carbono, por lo tanto pueden degradar la pared celular de hongos, es así que se encuentran relacionados con el control biológico de hongos fitopatógenos, participando activamente en la ecofisiología vegetal (Sastoque, 2005; Mukherjee & Sen, 2007).

3.4 Solubilización de fosfato

El fósforo, estrechamente relacionado a procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular, es el segundo fertilizante esencial después del nitrógeno, necesario para el desarrollo de microorganismos y plantas (Taurian, *et al.*, 2010).

En el suelo el fósforo se presenta en forma orgánica e inorgánica; las plantas lo absorben en su forma inorgánica soluble sin embargo, cuando se introduce al suelo en forma de fertilizante, más del 90% pasa a formas solubles no disponibles debido a procesos físicoquímicos como precipitación, adsorción y retención que se presentan al reaccionar con iones de calcio (en suelos alcalinos), hierro y aluminio (en suelos ácidos) que permiten su precipitación o fijación almacenándose en el suelo y evitando así su disposición para las plantas (Caballero, *et al.*, 2006; Malboobi, *et al.*, 2009; Taurian, *et al.*, 2010). La insuficiencia de fósforo en el suelo se refleja en la disminución del rendimiento de la cosecha, retardando la formación de semillas y madurez de las cosechas.

Los microorganismos solubilizadores de fosfato realizan transformaciones de compuestos orgánicos e inorgánicos del fósforo por mecanismos como: **I. Mineralización** de compuestos orgánicos, donde se convierte fósforo orgánico en fosfato mono y di-ácido (ión ortofosfato) por medio de enzimas fosfatasas ácidas de las plantas o las fosfatasas ácidas o básicas de microorganismos. **II. La solubilización** a través de la producción de ácidos orgánicos como el nítrico y el sulfúrico. Ácidos orgánicos como el oxálico, cítrico, láctico, succínico isovalérico, isobutírico entre otros, se producen como resultado de la descomposición de materia orgánica; estos ácidos permiten que haya solubilización ya que la presencia de estos implica un descenso en el pH hasta valores aproximados a 2, valores necesarios para que pueda llevarse a cabo la solubilización, mecanismo este que se favorece a pH bajos y con alto contenido de materia orgánica (Bobadilla, *et al.*, 2008) y **III. La inmovilización** se presenta cuando el fósforo se convierte en fósforo orgánico representado en biomasa, la cual no está disponible. **IV. La óxido-reducción**, es llevada a cabo por microorganismos que utilizan la forma fosfito de fósforo y lo transforman en fosfato dentro de la célula. Este mecanismo permite la movilización de este elemento, con la gran ventaja de no perturbar el medio ambiente al hacer parte de la flora nativa permitiendo una agricultura sostenible (Bobadilla, *et al.*, 2008).

En el estudio realizado por Sousa en el 2008 se reportó la capacidad de solubilizar fosfato por parte de los actinomicetos relacionado a la producción de ácidos orgánicos, donde el ácido glucónico es el más frecuente compuesto solubilizador (Sousa, *et al.*, 2008). Puesto que la producción de ácidos orgánicos sintetizados por bacterias es el mecanismo más común en la solubilización de fosfatos (Paredes & Espinosa, 2010), las bacterias ácido lácticas, debido a su producción de ácidos orgánicos del tipo láctico, acético y butírico son consideradas posibles solubilizadoras de fosfato.

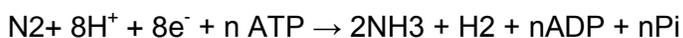
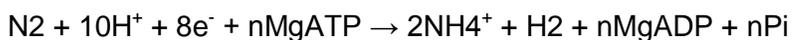
3.5 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los fertilizantes más importantes en una plantación; la aplicación de nitrógeno provee de suficientes nutrientes a la planta sin embargo, también contribuye a la contaminación ambiental debido a la cantidad excesiva de nitrato que resulta luego de una fertilización con nitrógeno; adicionalmente cada vez se utilizan mayores cantidades de fertilizante lo que incrementa los costos de producción de una plantación y adicionalmente mayor contaminación del medio ambiente (Aslantas, *et al.*, 2007), es por eso que las bacterias fijadoras de nitrógeno son una buena alternativa ya que son capaces de incrementar la captación de nitrógeno por las plantas.

El nitrógeno molecular (N₂) debido a su triple enlace, es una molécula que solo es aprovechada por un pequeño grupo de microorganismos (de vida libre o asociados) altamente especializados. Estos microorganismos, reportados en elevado número en las zonas adyacentes a la raíz, utilizan el N₂ como compuesto esencial para su crecimiento y desarrollo y adicionalmente otorgan a la planta el nitrógeno necesario y a su vez la planta le proporciona una fuente de carbono disponible en los exudados de la raíz (Agüero, 2009; Franco, 2008)

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un fenómeno que se lleva a cabo exclusivamente por procariotes, debido a que poseen el complejo enzimático nitrogenasa, formado por dos proteínas, la dinitrogenasa que contiene la proteína hierro-molibdeno (proteínas-Fe-Mo) codificada por los genes *nifD* y *nifK* y la dinitrogenasa reductasa que contiene la proteína hierro (proteína-Fe) codificada por el gen *nifH*, siendo la dinitrogenasa la proteína que poseen todos los microorganismos diazótrofos (fijadores biológicos de nitrógeno); sin embargo, algunas bacterias son capaces de sintetizar complejos de nitrogenasas sin molibdeno, posiblemente debido a que este elemento se encuentra en baja concentración, por lo tanto se unen a otros elementos como el vanadio (Va) o el hierro (Fe), a estas nitrogenasas se les conoce como nitrogenasas alternativas (Agüero, 2009; González, 2000; Acuña, 2010; Hernández, 2009).

La FBN consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico (N₂) a amoníaco (NH₃) o amonio (NH₄) mediante dicho complejo enzimático.



Siendo ($n \geq 16$)

Para reducir una molécula de N_2 se necesitan 8 electrones y un mínimo de 16 moléculas de ATP, adicionalmente se requiere la reducción de H^+ a H_2 , lo que significa un consumo significativo de reserva celular de ATP; puesto que esta reacción es energéticamente costosa, este proceso de FBN se emplea como último recurso, por lo tanto la expresión de dicho complejo enzimático es regulada por los microorganismos, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Agüero, 2009; Acuña, *et al.*, 2010).

La asimilación del amonio producto de la fijación del nitrógeno atmosférico se lleva a cabo por el sistema glutamino sintetasa-glutamato sintasa. La síntesis del complejo enzimático está codificada por tres genes llamados *nifHDK*, localizados en un operón. Los genes estructurales de la nitrogenasa que han sido secuenciados son el gen *nifH*, el gen *nifD* y el gen *nifK*. Los microorganismos fijadores de nitrógeno adicionalmente producen sideróforos para obtener el hierro necesario para llevar a cabo la fijación de este elemento (Espinosa & Mite, 2010).

La FBN ha sido reportada tanto para actinomicetos como para bacterias fotosintéticas no sulfurosas, actividad que ha sido reportada para estos últimos microorganismos desde 1949 en *Rhodospirillum rubrum*; en el 2008 Oda lo confirmó para *Rhodospseudomonas* (Ludden, *et al.*, 2002; Oda, *et al.*, 2008).

3.6 Objetivo específico

Seleccionar cepas de actinomicetos, bacterias ácido lácticas y bacterias fotosintéticas no sulfurosas con potencial biofertilizante mediante pruebas fisiológicas y de antagonismo.

3.7 Metodología

Con el fin de seleccionar de los aislamientos aquellos que demostraran mediante pruebas *in vitro* ser potenciales promotores de crecimiento vegetal, se planteó la realización de pruebas como solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, antagonismo contra patógenos de plátano y algunas bacterias patógenas de humanos, degradación de azúcares o descomponedores de materia orgánica y producción de indoles totales.

3.7.1 Producción de indoles totales

El efecto promotor de crecimiento *in vitro* por parte de los actinomicetos se evaluó en los 30 aislados, mediante la producción de indoles totales, a partir del medio B (Strzelczyk, *et al.*, 1984) suplementado con triptona (BT) (anexo E). Esta técnica se basa en la oxidación que produce el ácido sulfúrico en las moléculas de indol, lo que genera una coloración que varía del fucsia al rosado, que permite evidenciar la presencia de moléculas con grupo indol (Celis & Gallardo, 2008)

La cuantificación de la producción de indoles, fue desarrollada siguiendo el método propuesto por Glickman & Dessaux en 1995, para esto, se realizó una suspensión de actinomicetos a una concentración de 10^8 esporas/ml a partir de un conteo en cámara de

Neubauer. Posteriormente se realizó una dilución en base 10 (10^7 esporas/ml) que se usó como inóculo (1ml) para fiolas que contenían 9 ml del medio. Las condiciones de incubación fueron 30°C, 150 rpm por 3 días. Como control negativo se utilizó medio sin inocular y como control positivo *Azotobacter chroococum* cepa de Monibac®-CORPOICA (bacteria nativa de fincas algodonerías del Caribe seco colombiano, aislada a partir de un agroecosistema de algodón, sin ninguna manipulación genética). El ensayo fue realizado por triplicado.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se tomaron 1,5 ml de cada una de las fiolas y se centrifugó por 10 min a 13000 rpm, se recuperó 1 ml del sobrenadante al cual se le adicionó 1 ml del reactivo de Salkowsky (FeCl_3 40nM y H_2SO_4 7.9M); se dejó reaccionar durante media hora en completa oscuridad y a temperatura ambiente. Los que presentaron coloración rosada se llevaron a lectura en espectrofotómetro Thermo Spectronic™ Genesys 10UV (Madison, WI, USA) a 530 nm. La lectura se reportó en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de indoles totales, extrapolar las absorbancias a través de la curva patrón.

Para la curva patrón de indoles totales, se prepararon diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 28 y 30 $\mu\text{g/ml}$) de ácido indolil acético (AIA) comercial (Sigma) y se sometió a reacción en proporción de 1:1, reactivo de Salkowsky : patrón de AIA; la reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y la lectura se realizó a una absorbancia de 530 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado y se determinó la curva de calibración y la ecuación de la recta (anexo E) (Celis & Gallardo, 2008).

3.7.2 Evaluación de actividad antagonista *in vitro* contra bacterias patógenas para el cultivo de plátano

El antagonismo es un mecanismo basado en la actividad inhibitoria directa entre dos microorganismos, ya sea por competición por nutrientes, producción de enzimas líticas, inhibición de compuestos difusibles o combinación de varios de estos modos de acción (Getha & Vikineswary, 2002). El ensayo busca evaluar la capacidad de los aislamientos de actinomicetos y BAL para inhibir bacterias patógenas del cultivo de plátano (*Ralstonia solanacearum*, *Erwinia caratovora*, *Fusarium oxysporum*), así como para patógenos de humanos (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*), con el fin de inhibir cualquier contaminación que pueda ser introducida sin intención por los productores. Estas pruebas se realizarán mediante la técnica de “enfrentamiento” y la técnica “papel de filtro” se evaluó la actividad antagonista, dado la relevancia que tiene la calidad e inocuidad de los productos agrícolas (Cabrera, *et al.*, 2009).

▪ Enfrentamiento

Para esta prueba cualitativa se siguió la metodología propuesta por Swain & Ray (2009), con algunas modificaciones; En el caso de *F. oxysporum*, se tomó una asada del micelio del hongo para su crecimiento durante 5 días, una vez crecido el hongo se hizo un corte de un cuadrado de 1 cm x 1 cm que fue colocado en el centro de una caja de petri de agar YEM, posteriormente se realizaron a una distancia de 4 cm, cuatro líneas de inoculación cada una con un actinomiceto diferente, con una distancia de 2 cm entre

ellas, el período de incubación fue de 5 días a 30°C. Como control negativo se aplicó agua estéril. Con el resto de microorganismos, la metodología utilizada fue la propuesta por Lertcanawanichakul & Sawangnop (2008), se realizó una línea central indicando el sitio donde se inocularía el actinomiceto, mientras que en un ángulo de 90° se realizó la siembra de nuestros microorganismos patógenos, estos se incubaron a 37°C para el caso de la *Salmonella* y *E. coli* y a 30°C para *R. solanacearum* y *P. caratovorum*, cumplido el tiempo de incubación se inoculó el aislamiento de actinomicetos de interés y se dejó por 5 días a 30°C. La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición presentes. Como control negativo se utilizó una caja en donde se inoculó agua estéril en vez de los actinomicetos.

▪ **Papel de filtro**

Este método propuesto por Anukol (2004), consiste en crecer el microorganismo de interés en medio líquido y colocarlo a una concentración conocida en un papel de filtro, que luego será aplicado sobre una caja de petri que contiene un crecimiento masivo del microorganismo patógeno. En el ensayo, las BAL luego de un período de crecimiento de 24 h fueron comparadas con la escala de Mac Farland y llevadas cada una a una concentración de 1×10^7 células/ml; Esta concentración sirvió para impregnar un papel de filtro de 4 mm de diámetro que se colocó sobre la superficie de agar nutritivo previamente inoculadas por siembra en rejilla a una concentración de 1×10^7 células/ml determinada con la escala de Mac Farland de la bacteria patógena. El período de incubación fue de 24 h a 37°C para *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *E. coli* y a 30°C para *R. solanacearum* y *E. caratovora*. Esta prueba se determinó como positiva cuando se presentó una zona libre de crecimiento alrededor del papel de filtro. El control negativo consistió en colocar un papel de filtro impregnado de agua estéril.

3.7.3 Perfil enzimático por medio de la degradación de azúcares (celulosa, xilano y quitina).

▪ **Celulosa**

A partir de una asada de un cultivo reciente de actinomicetos se llevó a una concentración de 10^6 células/ml en solución salina, de la cual se sembraron 20 μ l en agar CarboxiMetilCelulosa (anexo F) y se llevó a incubación por 3 días a 30°C. Una vez finalizado el tiempo de incubación se adicionó rojo congo al 1% hasta cubrir completamente la colonia por un período de 15 min, para realizar un lavado de esta solución y observar con claridad los halos de degradación se adicionó NaCl 0.1 M por un período de 15 min, posteriormente se invirtió la caja para retirar las trazas de este reactivo. La prueba se determinó como positiva por la presencia de halos de degradación. Para el control negativo la inoculación fue realizada con agua estéril.

▪ **Xilano**

A partir de la dilución de 10^6 células/ml en solución salina, se sembraron 10 μ l en agar Xilano (anexo F) y se llevó a incubación a 30°C por 5 días. Finalizado el tiempo de incubación se realizó la lectura de los halos de degradación. La prueba se consideró

como positiva por la presencia de halos de degradación. Para el control negativo la inoculación fue realizada con agua estéril.

- **Quitina**

De la dilución de 10^6 células/ml en solución salina, se realizó una siembra de 10 μ l en agar Quitina con 1% de quitina (anexo F) como única fuente de carbono. El período de incubación fue de 5 días a 30°C, La prueba se determinó como positiva por la presencia de halos de degradación. Como control negativo la inoculación fue realizada con agua estéril.

3.7.4 Solubilización de fosfatos

La solubilización de fosfatos se ensayó en los aislamientos seleccionados de actinomicetos y BAL provenientes de Dibulla, Curumaní y María la Baja; se realizaron tanto pruebas cualitativas como cuantitativas.

- **Pruebas cualitativas de solubilización**

La habilidad de los aislados para solubilizar fosfato inorgánico fue demostrada sobre dos medios, agar Sundara, Rao y Shina (SRS) y agar Pikovskaya con fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), como fuente de fósforo inorgánico (anexo G); adicionalmente se probó agar SRS suplementado con roca fosfórica como fuente de fósforo inorgánico; La roca fosfórica es proveniente de una mina del municipio de Pesca en el departamento de Boyacá, con 30% de P_2O_5 (anexo G). Estas pruebas cualitativas se basan en la medición de los halos de solubilización (óxido-reducción, producción de fosfatasas y ácidos inorgánicos) y acidificación (disminución del pH por la liberación de ácidos orgánicos) que pueden generar las bacterias (Fernández, *et al.*, 2005).

El procedimiento consistió de una siembra por triplicado de 20 μ l de un cultivo líquido a una concentración de 10^8 UFC/ml de cada aislamiento, las cajas de petri para BAL fueron incubadas a 30°C hasta por 48 h con lectura a las 24 y 48 h; para los actinomicetos la incubación fue a 30°C por 5 días, con lecturas al tercero y quinto día.

Al finalizar el tiempo de incubación se evaluó el halo de solubilización (zonas de hidrólisis - aclaramiento) y halo de acidificación (cambio de color del medio), expresado en mm; adicionalmente se realizó el porcentaje de solubilización ($\text{PSE} = [\text{Z}-\text{C}/\text{C}] * 100$; donde Z= diámetro del halo de solubilización; C= Diámetro del halo de la colonia) (Valero, 2003; Kundu, 2008; Ramachandran, 2003). El control positivo fue *Enterobacter agglomerans* cepa del Laboratorio de Microbiología de Suelos - CORPOICA y el control negativo medio sin inocular.

- **Pruebas cuantitativas de solubilización de fosfato – determinación de fósforo disponible**

El contenido de fósforo soluble, se determinó a través del método de fosfomolibdeno, utilizando la prueba analítica Spectroquant® Fosforo (PMB) MERCK; esta técnica se basa en que en solución sulfúrica los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato,

dando ácido molibdofosfórico, el cual con ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno presentando al cabo de 5 min una coloración azul.

A partir de un cultivo inicial de los aislamientos a evaluar, se estableció una concentración de 1×10^7 células/ml con la escala de Mac Farland, de donde se inocularon 5 ml a fiolas con 45 ml de medio SRS con roca fosfórica y sin indicador de pH. Los cultivos se llevaron a incubar a 30°C, con agitación continua a 150 rpm por 3 días para BAL y 5 para actinomicetos. Como control negativo se utilizó un medio sin inocular y como control positivo se utilizó *Enterobacter agglomerans* cepa del Laboratorio de Micorbiología de Suelos - CORPOICA; Se realizó coloración de Gram para confirmar la pureza de las cepas. Cada aislamiento se realizó por triplicado.

Finalizado el tiempo de incubación, se tomaron de cada una de las fiolas una muestra de 2 ml en un vial y se centrifugaron a 3000 rpm por 8 min. En un tubo de vidrio, se adicionaron 500 µl del sobrenadante recuperado, 8 ml de agua destilada, 400 µl del reactivo 1 (iones molibdato en solución sulfúrica) y finalmente 0.5 g del reactivo 2 (ácido ascórbico) del Test de Fosfatos Spectroquant[®], la mezcla anterior se homogenizó en un vortex; la cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro Thermo Spectronic[™] Genesys 10UV (Madison, WI, USA) a 712 nm. La lectura se reportó en partes por millón (ppm) de fosfato soluble, extrapolando las absorbancias a través de la curva patrón.

Para la preparación de la curva patrón (Anexo G) se preparó una solución madre de fosfatos de 150 ppm a partir de esta solución y con la ecuación $V1 * C1 = V2 * C2$ ($V1 =$ Volumen 1, $C1 =$ Concentración 1, $V2 =$ Volumen 2 y $C2 =$ Concentración 2) se determinaron las concentraciones finales de fosfatos las cuales fueron leídas por duplicado en el espectrofotómetro a 712 nm.

3.7.5 Fijación de nitrógeno

Uno de los principales mecanismos por medio del cual se benefician las plantas, es la fijación biológica de nitrógeno por parte de los microorganismos rizosféricos (libres o simbióticos), ya que proveen a la planta de nitrógeno, pero a su vez estos microorganismos reciben las fuentes carbono que están disponibles en los exudados de las plantas (Franco, 2008).

▪ Crecimiento en medios libres de nitrógeno

Esta metodología busca obtener aislamientos totalmente puros, con la certeza de que el crecimiento presente en el medio no sufriera interferencia alguna por trazas de nitrógeno presentes en los pases; es por tal razón que los subcultivos permitieron determinar los aislamientos que debían seguir en las evaluaciones. Los medios utilizados en este proceso fueron agar Ashby el cual no posee fuente de nitrógeno sin embargo, posee hierro, elemento fundamental para la formación de las proteínas del complejo nitrogenasa. El segundo medio utilizado fue el medio jNfb, con consistencia semisólida, que permitió observar el crecimiento y la extensión del mismo hacia zonas microaerófilas, necesarias para que actúe la enzima.

Los actinomicetos aislados se sembraron mediante 2 pases sucesivos en agar Ashby (anexo H) aquellos que fueron capaces de llegar al segundo pase fueron sembrados en agar semisólido jNfb (anexo H) en pases sucesivos. El período de incubación fue de 7 días para las BFNS y de 5 días para los actinomicetos a una temperatura de 30°C.

▪ **Determinación de la actividad de reducción de acetileno**

Un microorganismo en fase exponencial en un medio sin fuente de nitrógeno, tiene la necesidad de asimilar cualquier compuesto que actúe como fuente inicial de nitrógeno, que induzca el crecimiento bacteriano y la fijación de nitrógeno a bajas concentraciones de oxígeno. Esta prueba busca medir de manera indirecta la fijación de nitrógeno, al determinar la actividad de la enzima nitrogenasa (inespecífica) que cataliza la reducción de acetileno (análogo estérico del nitrógeno) a etileno y mide de forma directa la presencia de esta enzima cuya función biológica es reducir nitrógeno a amonio (Franco, 2008).

Los aislamientos recuperados del último pase en medio semisólido se inocularon en tubos de 20 ml de capacidad con 3 ml de medio jNfb semisólido, se incubaron con tapón de algodón (3 días para las BFNS y hasta 5 días para los actinomicetos), hasta observar crecimiento a una temperatura de 30°C. Al cabo de este tiempo, se reemplazó el tapón de algodón por uno de caucho y se selló herméticamente. Se reemplazó el 10% de la atmósfera del frasco de cultivo con acetileno y se incubó 1 h a temperatura ambiente (Garrido, 2007)

La concentración de etileno se midió inyectando 1 ml de la atmósfera del tubo de cultivo en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer con detector de ionización de llama y una columna Poropak N 200/300 mesh de 6 pies y 3 mm de diámetro. Las condiciones de procesamiento fueron las presentadas por Garrido en el 2007.

La actividad de reducción de acetileno para cada aislamiento, se calculó según la altura del pico de etileno en el cromatograma extrapolando en la curva patrón (anexo H). La curva de calibración fue sometida a regresión lineal y se construyó a partir de diluciones seriadas de etileno en concentraciones de 1, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 y fue corrida en las mismas condiciones del cromatógrafo.

3.7.6 Diseño estadístico

Los resultados obtenidos de manera cuantitativa tanto para solubilización de fosfatos como para fijación de nitrógeno, se analizaron mediante multifactor ANOVA y pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y test de homogeneidad de varianzas (Barlett); por medio del sistema estadístico SAS.

3.8 Resultados y Discusión

3.8.1 Producción de indoles totales

La producción de AIA se ve afectada por condiciones del cultivo, disponibilidad de sustratos y las diferentes vías de producción de las auxinas. Algunos cultivos

microbianos pueden producir pequeñas cantidades de AIA en ausencia de un precursor fisiológico sin embargo, la presencia de triptófano permite que se libere gran cantidad de AIA y sus derivados. Se ha reportado que la cantidad de oxígeno y la limitación de nitrógeno, condiciones ampliamente distribuidas en el suelo elevan la producción de AIA y la fijación de nitrógeno (Carcaño, *et al.*, 2006).

El AIA es sintetizado por diferentes vías metabólicas que pueden o no depender del triptófano, es así que la presencia de indoles en el medio es directamente proporcional a la intensidad de la coloración rosada del mismo (fotografía 3-1); Con base en los análisis realizados para la determinación de indoles totales de los 30 aislamientos de actinomicetos muestreados, 15 fueron productores de indoles totales sin embargo, los aislamientos presentaron una producción más baja con respecto al control (*Azotobacter chroococcum*), los valores registrados variaron de 0,58 $\mu\text{g/ml}$ en el aislamiento 71CA (Curumaní) a 13 $\mu\text{g/ml}$ en el aislamiento 2DA (Dibulla). Los resultados de la producción de indoles totales por parte de las cepas de actinomicetos seleccionados al igual que los de la cepa control se presentan en la figura 3-1.

Fotografía 3-1: Producción de indoles totales. Tubo 1: Control negativo, Tubos 2-4: Control positivo, Tubos 5-7: aislamiento 9DA.

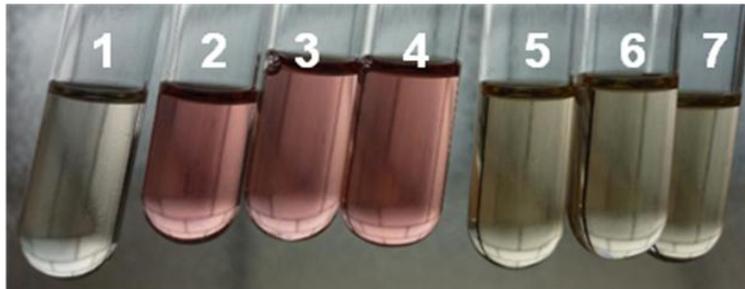
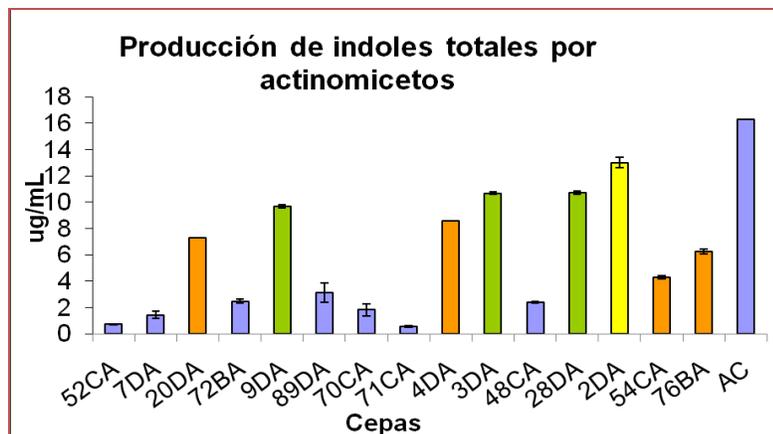


Figura 3-1: Producción de indoles totales en 15 aislamientos de actinomicetos obtenidos a partir de rizosfera de plátano, adicionalmente se presenta el control *Azotobacter chroococcum* (AC).



Varios estudios han demostrado la producción *in vitro* de AIA como una característica de las cepas de actinomicetos, es así que Castellanos (2009) en su reporte de 6 actinomicetos de origen colombiano, productores de AIA muestra que a pesar de que se produce AIA, los valores reportados no son superiores a 5 µg/ml, valor similar al que reportó Dimkpa (2008) para 13 cepas de actinomicetos. Este valor se tomó como referencia para identificar los mejores productores de indoles, como resultado 15 de los aislamientos productores de indoles superaron el valor de referencia variando de 6,28 a 13 µg/ml. Franco en el 2008 reporta valores máximos de producción de indoles entre 3,05 y 11,9 µg/ml para cepas colombianas de actinomicetos aisladas de suelo virgen, mientras Suttiviriya (2008) reportó valores entre <2 y 19 µg/ml, estos valores son similares a los encontrados en nuestro estudio, pero son bajos comparados con los estudios de Matsukawa (2007) quien reportó concentraciones entre 21,8 a 51,5 µg/ml, al igual Gopalakrishnan (2010) reportó valores de 43,7 µg/ml y Khamna y cols (2009) reportaron valores de 5,5 a 144 µg/ml para actinomicetos en general, mientras que específicamente para *Streptomyces* encontraron valores entre 11 y 144 µg/ml (Khamna, *et al.*, 2010), es de aclarar que estos últimos reportes provenientes de suelos de Tailandia y de colecciones de Japón.

Castellanos (2009) señala que los actinomicetos crecieron durante 12 días con toma de muestra a los días 0, 4, 8 y 12 y adicionalmente señalan que en el día 4 y 8 es donde se observa la producción de AIA haciendo referencia a su lento crecimiento, mientras Franco (2008) hace mediciones consecutivas entre el día octavo y el onceavo; Khamna (2009) por su parte reportaron valores de producción con otro método de cuantificación y después de 7 días de incubación sin embargo, es de resaltar que en nuestro estudio hubo una única toma de muestra, al día tercero de incubación, donde se observó una mayor producción de indoles totales a la reportada por estos dos investigadores.

Los datos obtenidos en este estudio corroboran la capacidad de los actinomicetos provenientes de Dibulla, Curumaní y María la Baja para producir indoles, aunque las concentraciones sean bajas en comparación a otros estudios se presume que pueden ser suficientes para producir fitoestimulación ya que estos reguladores de crecimiento actúan en bajas concentraciones (García, *et al.*, 2005). Estas cepas podrían ser utilizadas como promotores de crecimiento de plantas ya que es conocido que los microorganismos productores de indoles promueven la elongación de la raíz y el crecimiento de las plantas (Patten, *et al.*, 2002)

Hernández (2004) en su reporte de caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz, capaces de producir metabolitos del tipo AIA reportaron *Burkholderia* y *Pseudomonas* con producción de AIA entre los 5,3 y 21,53 µg/ml, mientras que Taurian (2010) reportó valores entre 6,2 y 37,4 µg/ml, para bacterias del género *Pantoea agglomerans* anteriormente conocida como *Enterobacter agglomerans*.

Los actinomicetos son microorganismos resistentes, apropiados para aplicar en suelo, puesto que sus esporas son capaces de resistir la desecación y presentar una ligera resistencia al calor húmedo y seco; adicionalmente los actinomicetos pueden colonizar el suelo debido a sus naturaleza filamentososa y a que es capaz de adherirse a las partículas sólidas del suelo y persistir por largos periodos hasta la presencia de substratos exógenos (Hamdali, *et al.*, 2008; Shrivastava, *et al.*, 2008). El hecho de que los actinomicetos sean productores de AIA es de suma importancia puesto que este ha sido

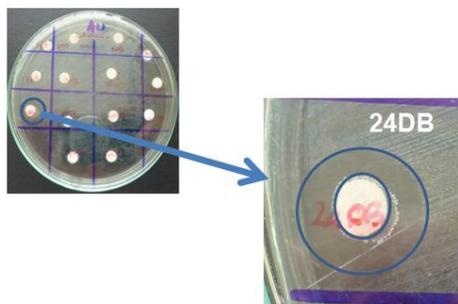
relacionado con la formación de micelio aéreo y la producción de metabolitos secundarios, características que se encuentran relacionadas con su actividad como microorganismos eficientes (Matsukawa, 2007).

3.8.2 Evaluación de actividad antagonista *in vitro* contra bacterias patógenas para el cultivo de plátano

En el medio ambiente los microorganismos se encuentran en equilibrio, en una completa interacción, donde los antagonistas con sus metabolitos controlan la población de los patógenos potenciales. Diversos miembros tanto de las bacterias ácido lácticas, así como de los actinomicetos son reconocidos por producir diferentes sustancias antibacterianas, cualidad que puede ser aprovechada como una forma de control biológico contra patógenos vegetales.

Respecto a los resultados obtenidos, de los 15 aislamientos de BAL ensayados contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *F. oxysporum*, *R. solanacearum* y *P. caratovorum*, solo 3 (9DB, 40CB y 44CB) presentaron antagonismo a las 24 y 48 h sin embargo, este antagonismo solo fue registrado contra *E. caratovora* y los halos de inhibición resultantes fueron pequeños (4 mm) (tabla 3-1; fotografía 3-2) en comparación a los 15 mm de diámetro de inhibición que reporta Visser (1986) contra *Pseudomonas syringae*, *Erwinia caratovora* y *Xantomona campestris*.

Fotografía 3-2: Antagonismo por bacterias ácido lácticas contra *E. caratovora*. Halo de inhibición del aislamiento 24DB.



Aunque se han reportado cepas de *Lactobacillus* con actividad inhibitoria sobre *E. coli* (Cadirci & Citak, 2005), *Salmonella* (Estrada, *et al.*, 2005) entre otros patógenos, en este estudio no se pudo corroborar dichos resultados, esto podría deberse a que en dichos reportes el disco fue impregnado del sobrenadante donde posiblemente recuperaban los metabolitos y bacteriocinas. Adicionalmente puede que el haber impregnado los discos de papel de filtro solo con los cultivos bacterianos además de perderse los metabolitos excretados durante la fase de crecimiento, probablemente se necesitaba un mayor tiempo de incubación para que los halos de inhibición pudieran haber sido detectados. Otra posible explicación es que el medio de cultivo (agar nutritivo) no era el adecuado para el crecimiento de ambas bacterias y no favoreció la expresión de los genes codificantes para los metabolitos de acción antagonica.

Tabla 3-1: Diámetro de zonas formadas en agar nutritivo por los 15 aislamientos de BAL contra las bacterias patógenas.

Aislamiento	Diámetro de Zona de Inhibición en mm ⁸					
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>E. caratovora</i>
1DB	*	*	*	*	*	*
3DB	*	*	*	*	*	*
5DB	*	*	*	*	*	*
6DB	*	*	*	*	*	*
7DB	*	*	*	*	*	*
9DB	*	*	*	*	*	4
18DB	*	*	*	*	*	*
19DB	*	*	*	*	*	*
24DB	*	*	*	*	*	*
39CB	*	*	*	*	*	*
40CB	*	*	*	*	*	4
41CB	*	*	*	*	*	*
44CB	*	*	*	*	*	4
47CB	*	*	*	*	*	*
61BB	*	*	*	*	*	*

& Promedio de la lectura de las tres réplicas * No se presentó diámetro de inhibición

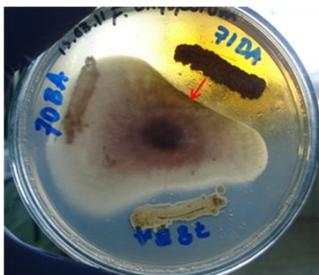
Los ensayos *in vitro* parecen ser útiles para identificar cual *Streptomyces* podría funcionar en suelo, ya que usualmente aquellas cepas que no logran una acción antagonica *in vitro* tampoco lo hacen a nivel *in vivo* (Getha & Vikineswary, 2002).

El mecanismo de acción del antagonismo por parte de los actinomicetos puede ser debido a: 1. Una antibiosis generalmente relacionada a la producción de metabolitos antibacterianos y antifúngicos algunas veces de tipo volátil. 2. Un hiperparasitismo. 3. A enzimas degradadoras de pared celular (El-tarabily, *et al.*, 2006; Oskay, *et al.*, 2004; Franco, 2008), o indirectamente debido a: 1. La producción de sideróforos, 2. Competencia por nutrientes y 3. Inducción de resistencia sistémica. Se conoce adicionalmente que los *Streptomyces* poseen capacidad de lisar las hifas de los hongos gracias a la producción de quitinasas y glucanasas; la quitinasa es el principal componente de la pared celular de los hongos, altamente sensible a las quitinasas, aunque se cree que esta inhibición puede ser debida también a la inhibición de la germinación de la spora de los hongos (Schlatter, *et al.*, 2009, Getha & Vikineswary, 2002).

En cuanto a los resultados obtenidos de los ensayos realizados con los actinomicetos, estos presentaron antagonismo contra las diferentes especies patógenas, excepto contra *E. caratovora*. En estos ensayos se probaron tanto el método de difusión en disco como el método de enfrentamiento, este último para los hongos. De los 33 aislamientos ensayados 12 aislamientos en total presentaron antagonismo, siendo los aislamientos

49CA y 78BA los que presentaron antagonismo contra 4 de los 6 patógenos ensayados. En la fotografía 3-3 se muestran los halos de inhibición obtenidos para algunos de los actinomicetos luego de 5 días de incubación.

Fotografía 3-3: Antagonismo contra *Fusarium* por actinomicetos; en la fotografía se observan los aislamientos 70BA (no antagonístico contra *Fusarium*), 71DA y 78BA, estos dos últimos presentan halos de inhibición frente al patógeno a 3 días de exposición.



Para el patógeno *E. coli* los aislamientos 49CA y 78BA, presentaron antagonismo con un diámetro de halo de inhibición de 7 y 8 mm. Contra *S. enteritidis*, el antagonismo evidenciado fue por la acción de los aislamientos 30DA, 49CA, 64CA y 78BA, para el caso de la *S. typhimurium* los aislamientos 49CA y 55CA fueron los responsables de la inhibición, otro de los patógenos probados fue la *R. solanacearum*, siendo el aislamiento 78BA el que causó el antagonismo. El porcentaje del mayor halo de inhibición correspondió al aislamiento 78BA contra *F. oxysporum* (tabla 3-2).

De los 33 aislamientos analizados se encontró un mayor número de actinomicetos antagonistas contra *F. oxysporum* (9/12), esto soporta estudios realizados anteriormente (Getha & Vikineswary, 2002; Franco, 2008; Sembiring & Goodfellow, 2008) donde los actinomicetos poseen un alto potencial como inhibidores de antagonistas en especial *Fusarium*. Sin embargo se esperaría que un mayor número de actinomicetos presentaran antagonismo, ya que se conoce que son productores de más de 8,700 antibióticos descubiertos en comparación con los 2900 producidos por otras bacterias y los 4,900 producidos por hongos (Hopwood, 2006).

La razón a que este antagonismo no se evidenciara podría estar relacionado a que el pase para la prueba de crecimiento del actinomiceto y del patógeno se realizó el mismo día. Franco (2008) señala basada en otros autores que el crecimiento de los actinomicetos debe darse con anterioridad, ya que lo que se persigue es que se pueda prevenir la infección y no atacarla una vez establecida. Ahora bien las lecturas se realizaron a los 3, 5 y 7 días de incubación, quizá esto pudo determinar la presencia/ausencia de los halos de inhibición, ya que en condiciones de laboratorio los actinomicetos se desarrollan más lentamente, por lo tanto la esporulación directamente relacionada con la producción de metabolitos secundarios también va a ser lenta.

En el estudio realizado es de gran importancia determinar la presencia de actinomicetos con capacidad de suprimir patógenos que afectan el cultivo de plátano en especial el *F. oxysporum*, hongo productor del marchitamiento, una de las enfermedades más destructivas en banano en el trópico (Getha & Vikineswary, 2002).

Tabla 3-2: Diámetro de halos de inhibición formadas en agar nutritivo por los 15 aislamientos de actinomicetos contra las bacterias patógenas.

Aislamientos	Diámetro de Zona de Inhibición en mm ^{&}					
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>E. caratovora</i>
2DA	*	*	*	*	*	*
3DA	*	*	*	*	*	*
4DA	*	*	*	*	*	*
5DA	*	*	*	*	*	*
7DA	*	*	*	*	*	*
9DA	*	*	*	*	*	*
20DA	*	*	*	*	*	*
28DA	*	*	*	*	*	*
30DA	*	6	*	*	*	*
36CA	*	*	*	10	*	*
40CA	*	*	*	*	*	*
41CA	*	*	*	*	*	*
42CA	*	*	*	*	*	*
43CA	*	*	*	6	*	*
45CA	*	*	*	*	*	*
46CA	*	*	*	9	*	*
47CA	*	*	*	8	*	*
48CA	*	*	*	*	*	*
49CA	7	7	6	*	*	*
50CA	*	*	*	*	*	*
51CA	*	*	*	*	*	*
52CA	*	*	*	*	*	*
54CA	*	*	*	*	*	*
55CA	*	*	5	*	*	*
57CA	*	*	*	*	*	*
64CA	*	6	*	7	*	*
70BA	*	*	*	8	*	*
71CA DA	*	*	*	8	*	*
71CA - A - BA	*	*	*	*	*	*
72BA	*	*	*	*	*	*
76BA	*	*	*	*	*	*
78BA	8	7	*	11	8	*
89DA	*	*	*	*	*	*

& Promedio de la lectura de las tres réplicas; * No se presentó diámetro de inhibición

El uso de microorganismos para el control biológico es quizá la alternativa más económica en comparación a otros métodos de control ya que es más duradera y no causa contaminación ni disturbios ecológicos (Castillo-Fabela, *et al.*, 2001).

3.8.3 Perfil enzimático por medio de la degradación de azúcares (celulosa, xilano y quitina)

▪ Celulosa:

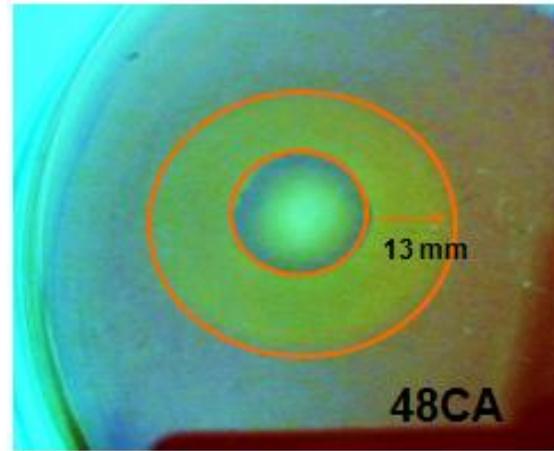
La celulosa uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal puede ser degradada por diversos microorganismos debido a la acción de diferentes enzimas que pueden ser intra o extracelulares sin embargo, la actividad de dichas enzimas puede ser inhibida por factores físicos y químicos (Ramírez & Cocha, 2003). Dentro de las enzimas que participan en el proceso de degradación de materia orgánica, las celulasas son una de las más importantes puesto que participan en el ciclo del carbono mediante la degradación de desechos vegetales, acción que está relacionada en la fertilidad y calidad de los suelos (Gutierrez, *et al.*, 2008).

Dentro de los microorganismos capaces de degradar este componente Solans & Vobis (2003) demuestra que son los actinomicetos y en especial los *Streptomyces* quienes poseen cerca de un 33% actividad degradadora de celulosa, pero adicionalmente son capaces de degradar otro tipo de material orgánico de origen vegetal como hemicelulosa, almidón, lignina y pectina, entre otros.

En estos ensayos cualitativos, se evaluaron 30 aislamientos de actinomicetos; todos los aislamientos mostraron un crecimiento abundante en los medios de cultivo, esto confirma la viabilidad de los inóculos empleados. Veintidós aislamientos presentaron halos de degradación entre 4 y 28 mm. Los aislamientos 9DA, 28DA, 40CA, 71DA, 71BA y 72BA presentaron halos superiores a los 26 mm representando el 20% (6/30) de todos los aislados. Halos de degradación de celulosa mayores de 20 mm se presentaron en 5 de los 30 actinomicetos (2DA, 3DA, 4DA, 5DA y 45CA) lo que representa un 17% de la población.

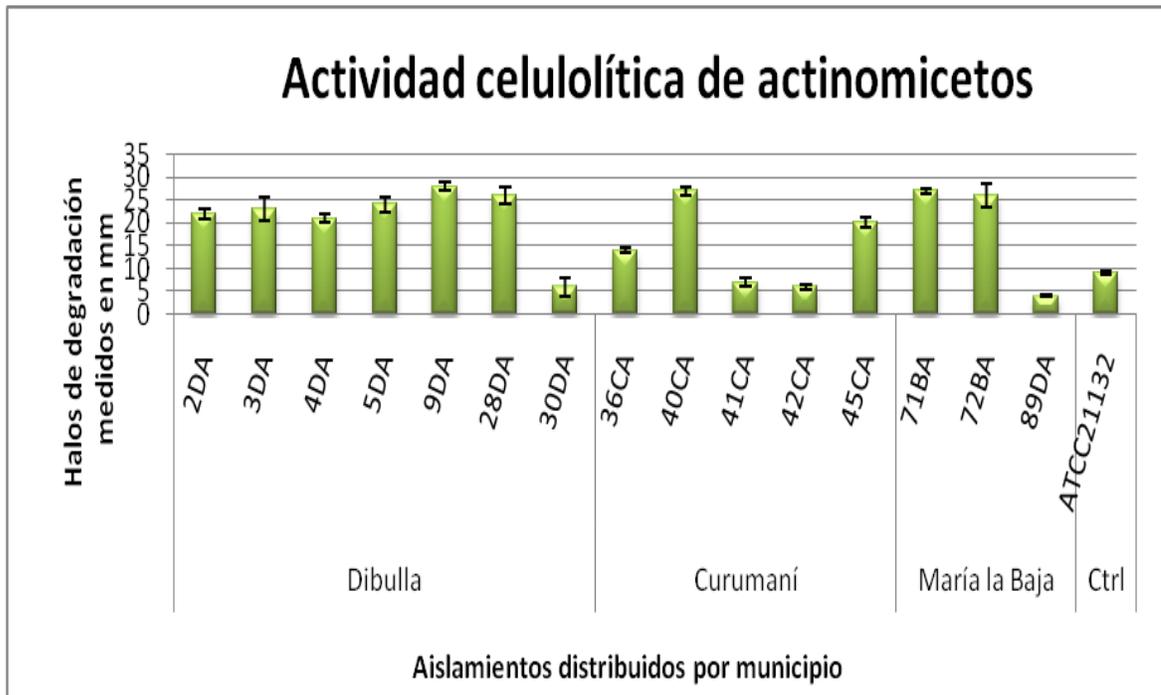
El aislamiento con el mayor halo de degradación fue 9DA del municipio de Dibulla. Ocho de los aislamientos no degradaron celulosa. La gran mayoría de microorganismos degradadores de celulosa fueron aislados del municipio de Dibulla sin embargo, el mayor número de actinomicetos provenían del municipio de Curumaní, donde 7 de los 8 microorganismos que no degradaron celulosa provenían de este municipio, en contraste en el municipio de María la Baja donde se cuenta con solo cuatro aislamientos, estos presentaron halos de degradación superior a los 10 mm. En la fotografía 3-4, se observa el halo de degradación de 13 mm del aislamiento 48CA en el agar CMC.

Fotografía 3-4: Halo de degradación de celulosa realizado por el aislamiento 48CA en agar CMC.



En comparación a la cepa control de *S. albus* ATCC 21132 que produjo un halo de 9mm, los halos fueron mayores para 15 de los aislamientos procesados (figura 3-2). Los actinomicetos aquí aislados presentan mejor actividad celulolítica que los aislados por Mikán & Castellanos (2004) puesto que 13 de los 30 aislamientos (43%) presentaron halos de degradación de celulosa mayores a 14 mm, máximo tamaño de degradación que presentaron los actinomicetos aislados por Mikán & Castellanos en 2004.

Figura 3.2: Comparación de tamaños de halos de degradación de carboximetilcelulosa por parte de los actinomicetos en comparación a la cepa control.



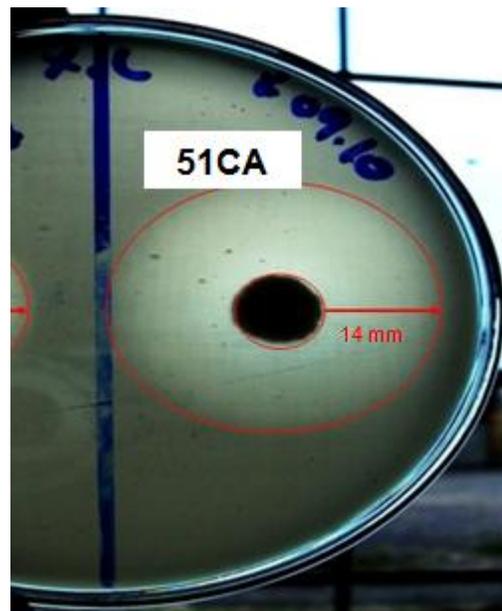
▪ **Xilano:**

El xilano es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa sin embargo, es degradado más rápidamente que la celulosa. La xilanasa, puede ser constitutiva o inducida.

En estos ensayos cualitativos, se evaluaron 30 aislamientos de actinomicetos, el crecimiento en los medios de cultivo fue abundante evidenciando de esta forma la viabilidad de los microorganismos. Veintidós aislamientos presentaron halos de degradación entre 2 y 19 mm. Los aislamientos 47CA y 51CA presentaron halos superiores a los 10 mm, mientras que 6 de los aislamientos presentaron halos de degradación mayores a 6 mm (36CA, 40CA, 42CA, 50CA, 70BA y 72BA) lo que representa un 20% de la población.

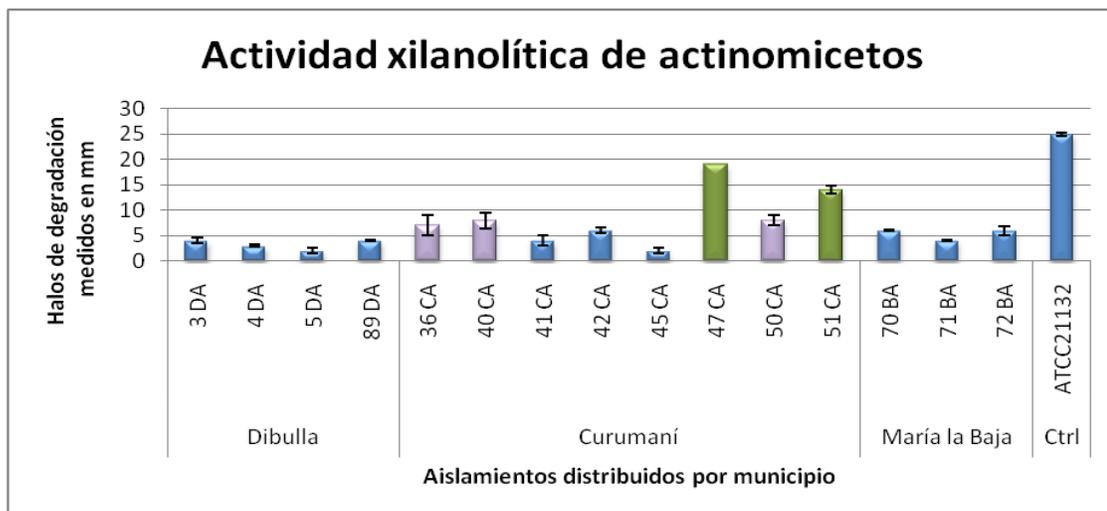
El aislamiento con un mayor halo de degradación fue 47CA aislado del municipio de Curumaní. Al igual que en la prueba anterior ocho de los aislamientos no degradaron xilano. De igual manera contrario a lo que sucedió con los degradadores de celulosa, la gran mayoría de los degradadores de xilano provenían del municipio de Curumaní donde se encuentran 6 aislamientos con halos de degradación mayores de 6 mm incluyendo los dos de mayor halo de degradación de este polisacárido. El municipio de María la Baja a pesar de ser el que menos aislamientos presenta, sus aislados presentaron halos de degradación de por encima de los 4 mm. En la fotografía 3-5, se observa el halo de degradación de 14 mm del aislamiento 51CA en el agar xilano.

Fotografía 3-5: Degradación de xilano realizado por el aislamiento 51CA del municipio de Curumaní sobre agar xilano.



En comparación a la cepa control *S. albus* ATCC 21132 mostró un halo de degradación de 25 mm superior a todos los halos de degradación de los actinomicetos aquí procesados (figura 3-3). Los resultados aquí obtenidos son inferiores a los presentados por Mikán & Castellanos (2004). Mikán reporta para actinomicetos halos de degradación superiores a los 14 mm, en el presente estudio dos aislamientos igualan y superan el halo de degradación reportado por Mikán, sin embargo el 67% de los aislamientos se encuentran en un rango entre 2-8 mm.

Figura 3-3: Comparación de tamaños de halos de degradación de xilano por parte de los actinomicetos en comparación a la cepa control.



▪ **Quitina:**

Al igual que el xilano, la quitina es otro de los compuestos más abundantes del planeta y se encuentra relacionado con protección y resistencia en animales inferiores como crustáceos, zooplancton y fitoplancton y hongos con excepción de los oomicetos, adicionalmente es uno de los polisacáridos más insolubles que existen y se encuentra en diferentes formas como alfa-quitina, beta-quitina y gama-quitina (Sastoque, 2005; Yoon, *et al.*, 2000).

En los actinomicetos, específicamente en *Streptomyces* se han descrito muchas quitinasas, de tipo endo y exocelulares, algunos microorganismos llegan a poseer una gran variedad de quitinasas como el caso de *S. lividans*, el cual posee tres enzimas para hidrolizar las diferentes clases de quitina que se encuentran en la naturaleza (Yoon, *et al.*, 2000).

De los 30 aislados de actinomicetos 23 fueron capaces de hidrolizar la quitina después de 3 días de crecimiento sobre agar suplementado con quitina como única fuente de carbono, las zonas de hidrólisis fueron observadas alrededor de la colonia hasta el día 7 de crecimiento, sugiriendo la presencia de actividad quitinolítica dentro de las proteínas secretadas y difundidas en el medio de cultivo. Los diámetros de los halos iban aumentando a través del tiempo de incubación encontrándose el tamaño más grande y medible después de 7 días de incubación (fotografía 3-6).

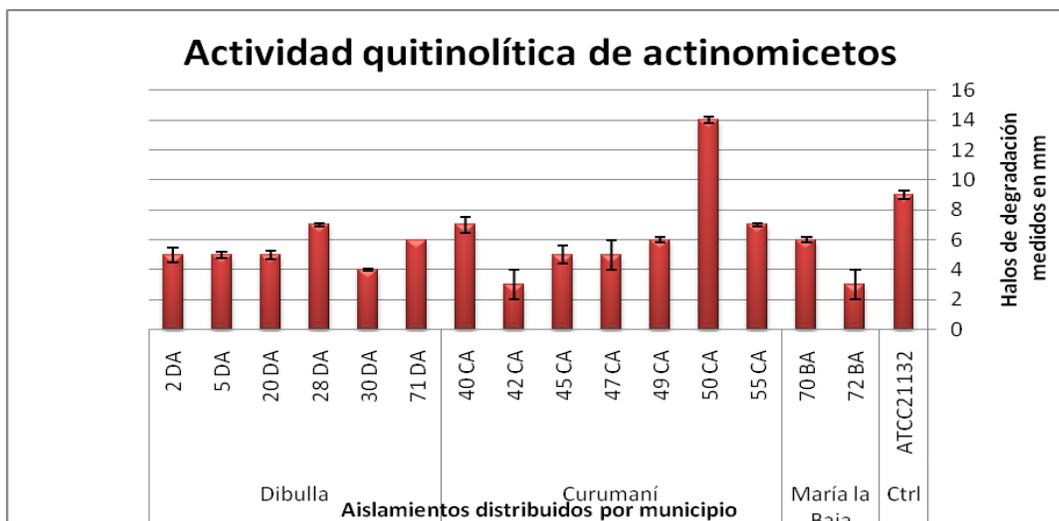
Al ser comparados con la cepa control *S. albus* ATCC 21132, que presentó un halo de degradación de 6 mm, se obtuvo un total 4 aislamientos que presentaron una mayor hidrólisis de la quitina coloidal presente en el medio y otros tres aislamientos igualaron el tamaño del halo de la cepa control.

El aislamiento con un mayor halo de degradación fue 50CA del municipio de Curumaní. La gran mayoría de microorganismos degradadores de celulosa fueron aislados del municipio de Dibulla, a pesar de que el municipio de Curumaní posee el mayor número de aislados (16), solo 10 (62%) de estos microorganismos fueron capaces de degradar quitina, mientras que todos los aislamientos del municipio de Dibulla fueron degradadores de quitina, a pesar de no presentar halos de degradación mayores de 7 mm (figura 3-4). En contraste en el municipio de María la Baja los aislados presentaron halos pequeños de degradación y solo uno de los aislamientos (70BA) presenta un halo de degradación de 6 mm. Siete de los aislamientos no degradaron quitina.

Fotografía 3-6: Halo de hidrólisis de quitina realizado por el aislamiento 50CA en agar suplementado con quitina coloidal.



Figura 3-4: Comparación de tamaños de halos de hidrólisis de quitina por parte de los actinomicetos en comparación a la cepa control.



3.8.4 Solubilización de fosfatos

El fósforo un elemento esencial para el crecimiento de las plantas, en el suelo puede estar en forma de fosfato orgánico e inorgánico, generalmente de forma insoluble no disponible para las plantas (Rodríguez, *et al.*, 2006; Taurian, *et al.*, 2010).

Dentro de los mecanismos de acción de las bacterias promotoras de crecimiento de plantas se encuentra la solubilización de fosfato inorgánico, por medio de la secreción de ácidos orgánicos y la producción de fosfatasas; estas bacterias tienen un papel importante en la nutrición de las plantas puesto que participan en la captura de fósforo por parte de las plantas lo que contribuye a la fertilización de cultivos (Taurian, *et al.*, 2010).

Microorganismos como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Agrobacterium* y *Azotobacter* (Rojas & Moreno, 2008; Chung, *et al.*, 2005; Fernández, *et al.*, 2005), son reconocidos como solubilizadores de fosfato; los actinomicetos también han sido incluidos dentro de este grupo (Hamdali, *et al.*, 2008) y aunque las BAL no son reconocidas por solubilizar fosfatos, se incluyeron en el estudio por la producción de ácidos orgánicos, estos ácidos se encuentran involucrados en la solubilización de fosfatos, ya que por medio de los grupos carboxilo o hidroxilo pueden quelar los cationes unidos al fosfato y liberarlo como fosfato soluble (Vassilev, *et al.*, 2006).

Dentro de los métodos existentes para detectar la solubilización de fosfato inorgánico, se encuentra la formación de halo de solubilización y la concentración de fósforo detectada en cultivos líquidos sin embargo, algunos microorganismos que poseen esta capacidad *in vitro* no son capaces de hacerlo *in vivo* (Fernández, *et al.*, 2005).

El total de los 15 aislamientos de BAL crecieron en agar Pikovskaya, en este agar la capacidad de solubilizar fosfatos se visualiza por la formación de halos transparentes alrededor de las colonias (fotografía 3-7). De los 15 aislamientos tres (6DB, 7DB y 24DB) fueron capaces de formar halos de solubilización, los cuales no superaron los 2 mm. En el medio SRS se puede observar tanto el halo de solubilización (color transparente alrededor de la colonia), como el halo de acidificación (cambio de color en el medio de morado a amarillo). Todas las BAL crecieron en este medio lo que indica que el medio posee los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias y que estas bacterias utilizan el fosfato presente en el medio.

La lectura a las 24 h del medio SRS con carbonato de calcio arroja como resultado porcentajes de solubilización entre el 22% y 57%, siendo los aislamientos 7DB y 61BB los que presentaron mayores porcentajes de solubilización 50 y 57% respectivamente. Los aislamientos 6DB y 24DB no presentaron halos de solubilización ni a las 24 ni a las 48 h en el medio suplementado con carbonato de calcio sin embargo, el aislamiento 24DB presentó halo de solubilización en el medio suplementado con roca fosfórica a las

48 h de incubación (22% de solubilización). En cuanto a los resultados de la lectura del medio suplementado con roca fosfórica, el porcentaje de solubilización varió para todos los aislamientos entre 14 y 33% (tabla 3-3).

Fotografía 3-7: Solubilización de fosfatos por actinomiceto (47CA) en agar Pikovskaya



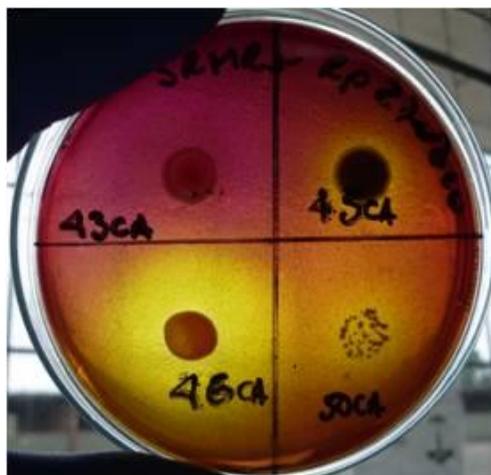
Tabla 3-3: Porcentaje de solubilización de fosfato realizado por bacterias ácido lácticas tanto en medio SRS suplementado con carbonato de calcio y SRS suplementado con roca fosfórica a las 24 y 48 horas de incubación.

Aislamiento	24 horas		48 horas	
	PSE-carbonato (%)	PSE – roca (%)	PSE-carbonato (%)	PSE – roca (%)
1DB	28,5	14,2	37,5	28,5
3DB	28,5	14,2	50	14,2
5DB	37,5	22,2	40	12,5
6DB	no	no	71,4	12,5
7DB	50	33,3	66,6	22,2
9DB	37,5	18,2	50	16,6
18DB	44,4	22,2	88,8	30
19DB	37,5	30	30	20
24DB	no	no	no	22,2
39CB	22,2	20	55,53	50
40CB	22,2	22,2	40	33,3
41CB	25	33,3	44,4	22,2
44CB	20	22,2	30	22,2
61BB	57,14	22,2	44,4	25

Quince de los 33 aislamientos de actinomicetos presentaron halos de solubilización en agar Pikovskaya sin embargo, al igual que las BAL, ninguno de los halos de solubilización sobrepasó 1 mm. En el medio SRS el único aislamiento que presentó halo de solubilización fue el 78BA (María la Baja) sin embargo, solo se presentó en el medio suplementado con roca fosfórica, tanto a los 3 como a los 5 días de incubación.

En cuanto a los halos de acidificación realizada en el medio SRS suplementado con carbonato de calcio (fotografía 3-8) a los 3 días de incubación 15 de los 33 aislamientos presentaron halos entre los 7 y los 22 mm; a los 5 días de incubación 5 actinomicetos adicionales fueron capaces de acidificar el medio; el máximo halo de acidificación fue de 25 mm y el mínimo fue de 11 mm. En el medio SRS suplementado con roca fosfórica a los 3 días de incubación, 23 de los 33 aislamientos presentaron halos entre los 12 y los 40 mm; a los 5 días de incubación 1 actinomiceto más fue capaz de acidificar el medio (anexo I).

Fotografía 3-8: Solubilización de fosfatos por actinomicetos en agar SRS con roca fosfórica (43CA, 45CA, 46CA y 50CA)



Los resultados obtenidos en agar Pikovskaya están muy por debajo de los reportados por Gupta (2007), para microorganismos aislados de minas de cromita, hierro y manganeso, donde en este agar reportan halos entre 14 y 41 mm a la misma temperatura trabajada en este estudio y a un pH de 7. Si se comparan con los datos presentados por Caballero & Camelo (2006), donde sus halos de solubilización oscilan entre 9 y 15,5 mm en agar SRS, para bacterias aisladas de suelos algodoneros del Cesar y Meta, los datos obtenidos en este estudio demuestran que solo uno de los aislamientos fue capaz de solubilizar tanto el fosfato tricálcico como la roca fosfórica, con un halo de 13 mm que está incluido en los valores obtenidos con Caballero & Camelo (2006).

De acuerdo a los resultados cualitativos se tomó el total de BAL para la realización de la determinación cuantitativa de solubilización de fosfato (fotografía 3-9), con valores que varían de 2,7 ppm a las 340,7 ppm (tabla 3-4).

Fotografía 3-9: Prueba cuantitativa de solubilización de fosfatos.

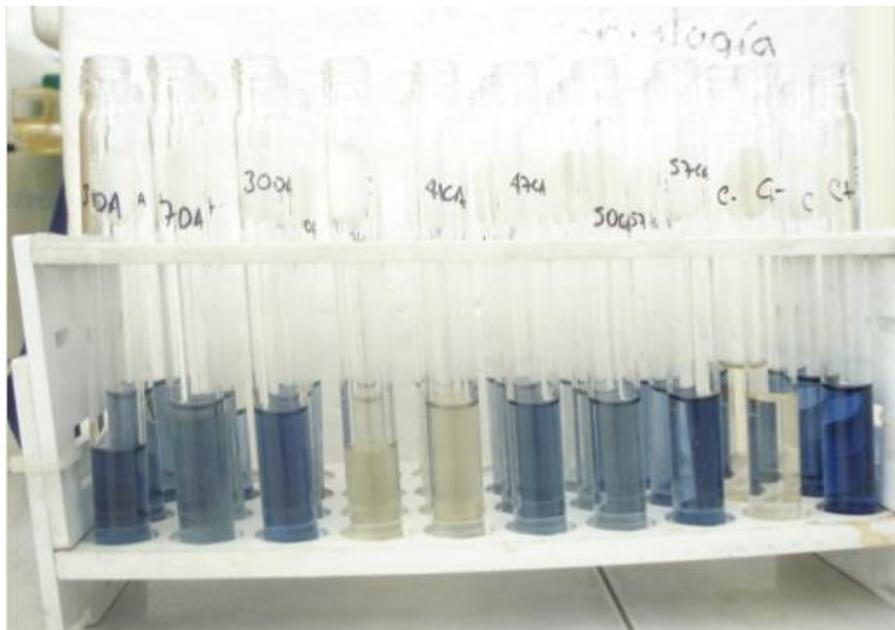


Tabla 3-4: Solubilización cuantitativa de fosfatos por bacterias ácido lácticas.

Aislamiento	ppm	Desviación estandard	Variación %
1DB	271,590	52,739	0,194
3DB	264,974	37,661	0,142
5DB	284,667	34,022	0,120
6DB	296,821	30,385	0,102
7DB	202,000	54,811	0,271
9DB	340,769	34,638	0,102
18DB	296,308	12,942	0,044
19DB	242,051	51,465	0,213
24DB	181,744	79,935	0,440
9DB	171,385	3,464	0,020
39CB	2,718	0,582	0,214
40CB	172,359	57,281	0,332
41CB	202,000	19,942	0,099
44CB	207,231	30,121	0,145
47CB	186,513	14,121	0,076
61BB	153,641	27,607	0,180
<i>Enterobacter agglomerans</i>	148,051	6,922	0,047

En el caso de los actinomicetos luego de obtener los resultados cualitativos, se escogieron al azar 23 aislamientos para realizar la actividad de solubilización de fosfato cuantitativamente, dando como resultado que 7 de estos aislamientos, solubilizaron fosfatos con resultados entre 15 y 95 ppm de fosfato liberado en el medio SRS suplementado con roca fosfórica (tabla 3-5).

Tabla 3-5: Solubilización cuantitativa de fosfatos por actinomicetos

Aislamiento	ppm	Desviación estandard	Variación %
54CA	3,1	2,09	0,67
49CA	15,3	41,39	2,70
3DA	95,4	62,51	0,66
7DA	31,9	13,48	0,42
47CA	17,3	1,57	0,09
57CA	51,0	2,60	0,05
76BA	39,2	2,85	0,07
<i>Enterobacter agglomerans</i>	127,6	31,4	0,2

Luego de los análisis estadísticos, los cuales tuvieron en cuenta el municipio, la muestra y el aislamiento de una forma anidada, no se encontraron diferencias significativas entre los municipios y las muestras pero si entre de los aislamientos ($p < 0.05$). La solubilización cuantitativa de fosfatos realizada por los aislamientos de actinomicetos 76BA y 30DA fueron similares a la del control. No se encontraron diferencias significativas entre los municipios, las muestras y los aislamientos. En cuanto a las BAL, se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos, y los aislamientos 7DB, 41CB, 40CB, 47CB y 61 BB (anexo J).

3.8.5 Fijación de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es una importante fuente de nitrógeno para las plantas, dado que el nitrógeno molecular de la biosfera no es fácilmente asimilable por las plantas, son ciertos microorganismos del suelo los que pueden realizar esta tarea, convirtiendo el nitrógeno en amoníaco por acción de la enzima nitrogenasa (Rajeswari, *et al.*, 2009; Lara, *et al.*, 2007).

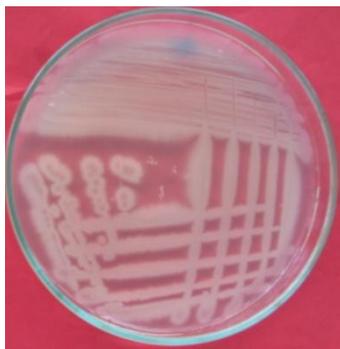
Tradicionalmente los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Azospirillum*, han sido clasificados como eficientes fijadores asimbióticos de nitrógeno (Lara, *et al.*, 2007; Caballero-Mellado, *et al.*, 2006). Sin embargo, otros géneros como los

actinomicetos y las bacterias fotosintéticas no sulfurosas han sido reportadas como fijadores de nitrógeno, debido a que poseen genes que codifican para las proteínas necesarias en el proceso de fijación de nitrógeno (dinitrogenasa y nitrogenasa reductasa) (Acuña, *et al.*, 2010; Achenbach, *et al.*, 2001; Ludden & Roberts, 2002). La capacidad de fijación de nitrógeno molecular varía dependiendo de la composición del medio, el pH del suelo, la temperatura, la aireación, la presencia de nitrógeno combinado, los microelementos y la acción de organismos antagonicos en el medio (Lara, *et al.*, 2007).

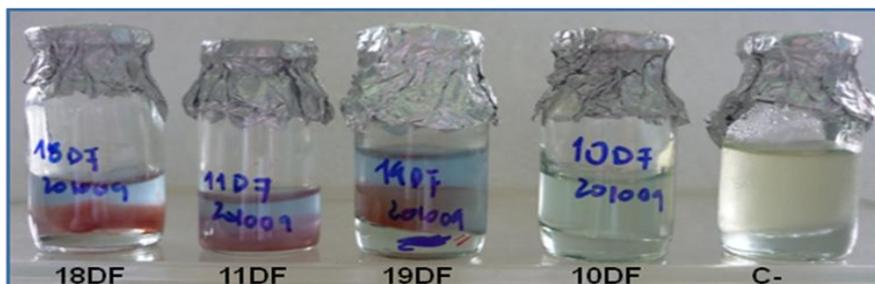
En el experimento cualitativo aquí realizado, medios de cultivo que carecen de nitrógeno, Ashby y jNfb, permiten obtener aislamientos totalmente puros donde no existen trazas de nitrógeno, el cual puede provenir de los medios de cultivo iniciales, si no hay contaminación posterior. Estos medios de cultivo además permiten que los microorganismos utilicen los elementos químicos que posee el medio tales como el hierro, fundamental para la formación de las proteínas del complejo nitrogenasa.

Luego de dos pases de los 28 aislamientos de BFNS en medio Ashby (fotografía 3-10) y dos en medio jNfb (fotografía 3-11), 21 de ellos crecieron exitosamente, mientras los otros 7 aislamientos, no crecieron en el medio jNfb, por lo tanto fueron descartadas.

Fotografía 3-10: Crecimiento de bacterias en agar Asby

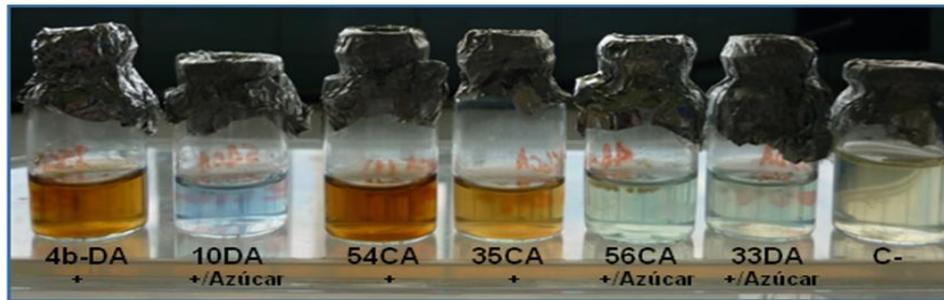


Fotografía 3-11: Medio jNfb con crecimiento de BFNS



En cuanto a los aislamientos de actinomicetos de los 30 aislamientos, 15 superaron el crecimiento en estos medios libres de nitrógeno (fotografía 3-12) y fueron seleccionados para pasar a una subsecuente prueba de reducción de acetileno.

Fotografía 3-12: Medio jNfb con crecimiento de actinomicetos.



La técnica reina para estimar la actividad nitrogenasa es una prueba de cromatografía de gases conocida como reducción de acetileno (ARA) (Lara, *et al.*, 2007). Este método se basa en el principio que el complejo de la nitrogenasa es capaz de catalizar la reducción de nitrógeno a amoníaco con la consecuente liberación de hidrógeno. El complejo también es capaz de reducir otros sustratos como el acetileno. Para las BFNS, la lectura de ARA se realizó a los tres días de crecimiento y para los actinomicetos a los 5 días de crecimiento, posiblemente en estos días las bacterias no hayan alcanzado su máximo de fase exponencial, por lo cual no se pudo determinar el punto de su máxima tasa de reducción de acetileno.

De los 28 aislamientos de BFNS, 21 fueron procesadas para ARA. Previamente, se había comprobado en estos aislados la presencia del gen *nifH* mediante PCR (fotografía 4-5). La cepa de BFNS utilizada como control positivo (Bis-B18) arrojó valores de reducción de acetileno de 158 nmol/hora/ml, mientras los valores encontrados de los aislamientos variaron entre los 130-160 nmol/hora/ml. En un ensayo realizado por Rojas & Moreno (2008) con bacterias del género *Azotobacter*, reportaron tasas de actividad nitrogenasa superiores a 2601 nmol/hora, lo que sería una alta tasa de fijación de nitrógeno en comparación con nuestros aislamientos, incluyendo el control aquí utilizado.

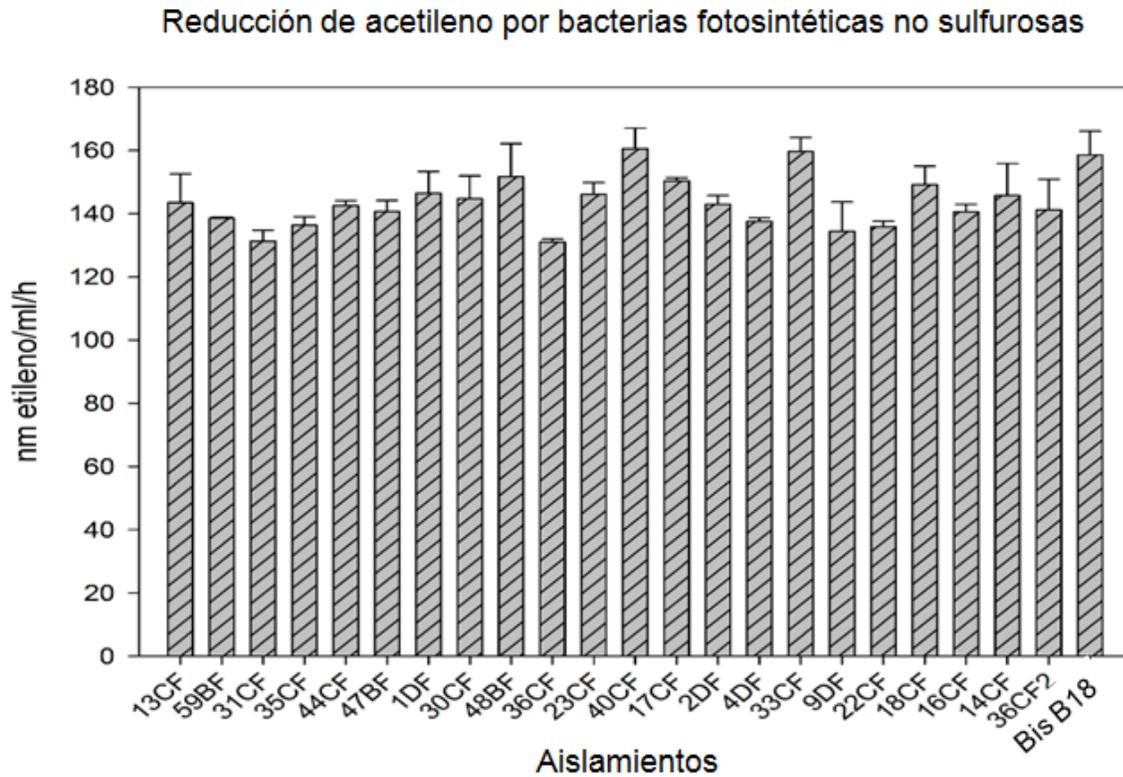
Cuantitativamente los aislamientos de actinomicetos de los tres municipios presentaron tasas de fijación que variaron entre 125-158 nmol/hora/ml, valor muy similar al encontrado en la cepa control Bis-B18 (figura 3-6).

Luego del análisis estadístico, el cual tuvo en cuenta el municipio, la muestra y el aislamiento de una forma anidada, no se encontraron diferencias significativas entre los municipios y las muestras pero si entre de los aislamientos ($p < 0.05$). La reducción de acetileno de los aislamientos el 5DA, 9DA, 54CA, 76BA y 89DA fueron similares a la del control en el caso de los actinomicetos; para las BFNS no se encontraron diferencias significativas entre los municipios, las muestras y los aislamientos; Los aislamientos 17CF, 18CF, 33CF, 40CF y 48BF, fueron similares al control en cuanto a los valores de reducción de acetileno (anexo J).

Los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja presentaron una tendencia de moderada a baja en cuanto a la cantidad de nitrógeno disponible, por lo tanto se espera que respondan a una fertilización nitrogenada, de tipo biológico o químico. Por lo tanto, el conocimiento en estos suelos de poblaciones microbianas nativas, eficientes fijadoras de nitrógeno, ofrecen una alternativa para la agricultura sostenible en la zona,

adicionalmente permitirá aprovechar esta diversidad en el desarrollo de un inoculante o biofertilizante para el cultivo de plátano.

Figura 3-6: Reducción de acetileno por bacterias fotosintéticas no sulfurosas comparadas con la cepa control Bis-B18.



4. Capítulo 4: Identificación molecular y diversidad microbiana

4.1 Diversidad microbiana del suelo

Los procariotes son los organismos más abundantes en el suelo e incluso pueden llegar a ser el mayor componente de la biomasa allí presente sin embargo, su presencia se ve influenciada por la disponibilidad de agua y nutrientes. La diversidad microbiana, así como su versatilidad es de gran importancia especialmente para la industria debido a que los microorganismos son fuentes de nuevos productos naturales incluyendo los antibióticos, adicionalmente son responsables de la mayoría de la transformación de nutrientes que puede influenciar la productividad de la planta (Will, *et al.*, 2010).

El suelo es considerado uno de los ambientes naturales más dinámicos en relación a la diversidad de especies y al tamaño de las comunidades presentes. A partir de estudios de varias muestras de suelo se ha estimado que el número de genomas procarióticos únicos por gramo de suelo, es de 2,000 a 18,000 genomas aproximadamente; sin embargo, este número podría no ser representativo ya que se pueden haber excluido de los análisis aquellos genomas no recuperados (Daniel, 2005; Roesch, *et al.*, 2007).

El cultivo y el aislamiento directo de los microorganismos son los métodos tradicionales utilizados para explorar la diversidad microbiana sin embargo, la gran variedad de esos microorganismos no son cultivables en el laboratorio (Liu, *et al.*, 2007), por tal razón se han diseñado métodos moleculares indirectos que buscan el aislamiento y análisis de ácidos nucleicos, sin necesidad de un cultivo bacteriano. Los ácidos nucleicos obtenidos a partir de la muestra de suelo representan la microflora nativa y se conocen como metagenoma (Daniel, 2005; Feinstein, *et al.*, 2009).

Filogenéticamente el metagenoma puede ser identificado por medio de una amplificación por PCR con genes conservados, haciendo uso de iniciadores universales; esta aproximación permite comparar la diversidad microbiana en diferentes hábitats, así como también identificar cambios en una misma comunidad, adicionalmente permite ilustrar el panorama en cuanto a diversidad funcional y abundancia de la población de los microorganismos allí presentes.

Dentro de las técnicas utilizadas para realizar la identificación microbiana tenemos la secuenciación de librería de clones, electroforesis en gel denaturante y los microarreglos, las cuales poseen menor sensibilidad. A pesar de la valiosa información que aportan estas técnicas su alcance es limitado, consumen tiempo y su costo es elevado. Nuevas aproximaciones moleculares como la pirosecuenciación, se ofrecen como alternativas más económicas, menos dispendiosas y con la capacidad de caracterizar muchas

muestras ambientales en paralelo y develar mayor variabilidad intra e inter específica (Daniel, 2005; Liu, *et al.*, 2007; Will, *et al.*, 2010).

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación de nueva generación basada en la detección de pirofosfato (PPi) liberado durante la síntesis de DNA, esto permite la determinación de secuencias en tiempo real. En esta técnica la síntesis de la cadena complementaria al ADN de interés y los nucleótidos son añadidos de manera consecutiva a la reacción y cuando hay incorporación del mismo se libera PPi lo que desencadena una cascada de reacciones enzimáticas, resultantes en producción de luz, que es proporcional al número de nucleótidos incorporados (Ronaghi, 2001). El sistema de FLX de la plataforma 454 es una de estas tecnologías más versátiles que pueden caracterizar una única mezcla con un alto rendimiento y precisión excepcional (Droege & Brendon, 2008; Ahmadian, *et al.*, 2006).

En suelo se han realizado estudios para analizar la comunidades microbianas no solo en la parte superior del suelo (horizonte A), sino también en horizontes inferiores (Horizonte B), cuyos resultados develan la biogeografía de las comunidades microbianas que están en baja o alta abundancia en el suelo, ya sean de suelos dedicados al pastoreo, suelos de bosque vírgenes o suelos dedicados al cultivo ya sean fertilizados o sin fertilizar (Will, *et al.*, 2010; Jones, *et al.*, 2009; Roesch, *et al.*, 2007)

4.2 Objetivo específico

Identificar los microorganismos seleccionados molecularmente, mediante la secuenciación de regiones variables del gen 16S rRNA. Adicionalmente se planteó estimar la diversidad, abundancia relativa y composición de las comunidades microbianas, por medio de pirosecuenciación de los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja.

4.3 Metodología

Con el fin de identificar molecularmente los microorganismos se planteó una primera identificación con iniciadores específicos para cada grupo funcional, que apoyaran la identificación macroscópica y microscópica, para lo cual se planteó la siguiente estrategia:

4.3.1 Recuperación de biomasa para extracción de DNA de BFNS Actinomicetos y BAL

La extracción de DNA de BAL y BFNS se realizó a partir de caldos de cultivo con medios de crecimiento específicos para cada una de los grupos bacterianos descritos con anterioridad. Para recuperar la biomasa se pasaron a viales estériles 2 ml del cultivo y se centrifugaron a 13,000 rpm por 2 min, los sobrenadantes fueron descartados; este proceso se realizó hasta recuperar toda la biomasa presente en el cultivo (Rodríguez, 2004).

4.3.2 Extracción de DNA

Se utilizó el protocolo de la “International Atomic Energy Agency” (IAEA) (Rodríguez & Rodríguez, 2004). A cada vial con la biomasa recuperada, se le adicionaron 0,1 g de perlas de zirconio de alta densidad (1 mm de diámetro) estériles, 1000 µl de buffer de lisis (40 mM Tris-HCl, 20 mM AcoNa, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS), 100 µl de acetato de potasio 5 M y 100 µl de agua grado biología molecular, la mezcla se resuspendió en vortex y fueron agitadas en un Mini Bead-Beater-8 (Biospec BioSpec, Oklahoma, USA) por 1 min. A continuación se realizó un choque térmico al llevar los viales por 5 min a un congelador de -80°C y una vez cumplido el tiempo, se colocaron en agua hirviendo hasta completa descongelación y nuevamente pasaron al mini Bead-Beater-8 por 1 min, posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm, por 15 min a 4°C. Se tomaron 300 µl del sobrenadante y se adicionaron 600 µl de glass milk (matriz de ligamiento), se homogenizó por inversión manual durante 5 min. Los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 2 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y se le agregaron 500 µl de etanol frío al 70%, nuevamente se llevó al Bead-Beater-8 por 1 min y luego a centrifugar a 10,000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secando toda la noche. A los viales se les adicionaron 100 µl de agua grado molecular, se llevaron a agitación por 1 min y a centrifugar por 2 min a 13,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se pasó a viales estériles y se mantuvieron en congelación a -20°C.

Para confirmar la extracción exitosa de DNA, se adicionaron 8 µl de cada muestra en geles de agarosa al 2%. Los geles se corrieron en TAE 1X a 50 V durante 1 h y posteriormente fueron teñidos en bromuro de etidio durante 20 min y visualizados en un documentador de geles (GelDoc™ XR, BioRad, UK), adicionalmente se cuantificó el DNA extraído en un nano-espectrofotómetro, ND-100 (NanoDrop®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos).

4.3.3 Identificación molecular para el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL)

Al DNA previamente extraído a cada una de las cepas de BAL se les amplificó un fragmento de 340 pb del gen del 16S rRNA, la pareja de iniciadores utilizada fue Allact-For (5´- TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA -3´) y Allact-Rev (5´- AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT -3´) (Haarmann & Knol, 2006).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl e incluyeron un control negativo de agua grado biología molecular y un control positivo con DNA de la cepa de referencia *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Cada reacción se realizó con 1.5 µl de DNA ajustado a una concentración de 50 ng/µl, 2 U de Taq Polimerasa (BIOLINE), 1X de Buffer de PCR, 1,0 µM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleótido, 0,2 µM de cada iniciador y 0,4X de BSA.

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research®, Inc. Minnesota, Estados Unidos) y el programa de PCR consistió de un paso de denaturación a 95°C por 2 min, 40 ciclos con denaturación a 95°C por 30 s, anillaje a 61°C por 1 min y extensión a 68°C por 1 min y una extensión final de 7 min a 68°C.

4.3.4 Identificación molecular para el grupo de bacterias fotosintéticas no sulfurosas (BFNS)

La pareja de iniciadores *pufM.557F* (5'- CGC ACC TGG ACT GGA C -3') y *pufM.750R* (5'- CCC ATG GTC CAG CGC CAG AA -3') se utilizó para amplificar un fragmento de aproximadamente 229 pb del gen *pufM* que codifica para una proteína de la subunidad M del centro de reacción de fotosíntesis de las BFNS y bacterias fotosintéticas sulfurosas (Achenbach, *et al.*, 2001).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl e incluyeron un control negativo de agua grado biología molecular y un control positivo con DNA de la cepa referencia *Rhodospseudomonas palustris* ATCC 17007, obtenida del Departamento de Microbiología de la Universidad de Washington (Seattle). Cada reacción se realizó utilizando el PCR Supermix (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante con 1,5 µl de DNA ajustado a una concentración de 50 ng/µl y 0,2 µM de cada iniciador.

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research®, Inc. Minnesota, Estados Unidos) y el programa de PCR consistió de un paso de denaturación a 94°C por 3 min, 30 ciclos con denaturación a 94°C por 1 min, anillaje a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min y una extensión final de 10 min a 72°C.

4.3.5 Identificación molecular para el grupo de los actinomicetos

Se utilizó la pareja de iniciadores F1 (5'- AGA GTT TGA TCI TGG CTC AG -3'; I = inosina) y R5 (5'- ACG GIT ACC TTG TTA CGA CTT -3'), para amplificar un fragmento de aproximadamente 1500 pb del gen del 16S rRNA de actinomicetos; el primer F1 se une a la posición 7-26 y el primer R5 a la posición 1496-1476 del gen 16S rRNA (Cook & Meyers, 2003).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl e incluyeron un control negativo de agua grado biología molecular y un control positivo con DNA de la cepa de referencia *Streptomyces griseus* ATCC 10137. Cada reacción se realizó utilizando el PCR Supermix (Invitrogen®) según las instrucciones del fabricante con 1,5 µl de DNA ajustado a una concentración de 50 ng/µl y 0,2 µM de cada primer.

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research®, Inc. Minnesota, Estados Unidos) y el programa de PCR consistió de un paso de denaturación a 96°C por 2 min, 30 ciclos con denaturación a 96°C por 45 s, anillaje a 56°C por 30 s y extensión a 72°C por 2 min y una extensión final de 5 min a 72°C.

4.3.6 Confirmación de PCR

Para confirmar la amplificación exitosa de DNA, se adicionó 5 µl de cada muestra en geles de agarosa al 1%. El gel se corrió en TAE (Tris-acetato EDTA) 1X a 50V durante 1 h y posteriormente fue teñido en SYBR Safe (Invitrogen®) a una concentración de 1X

durante 20 min, para ser luego visualizados en un documentador de geles (GelDoc™ XR, BioRad, UK).

4.3.7 Identificación molecular de la presencia del gen *nifH* para confirmar la presencia de la enzima nitrogenasa

La pareja de iniciadores utilizada fue Forward (5´- GGT TGT GAC CCG AAA GCT GA -3´) y Reverse (5´- GCG TAC ATG GCC ATC ATC TC -3´), para amplificar un fragmento de aproximadamente 400 pb del gen *nifH* de actinomicetos y BFNS (Rajeswari &Kasthuri, 2009).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl e incluyeron un control negativo de agua grado biología molecular y DNA de la cepa referencia *Rhodopseudomonas palustris* Bis B18, obtenida del Departamento de Microbiología de la Universidad de Washington (Seattle). Cada reacción se realizó utilizando el PCR Supermix (Invitrogen®) según las instrucciones del fabricante con 1,5 µl de DNA ajustado a una concentración de 50 ng/µl y 0,2 µM de cada primer.

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research®, Inc. Minnesota, Estados Unidos) y el programa de PCR consistió de un paso de denaturación a 94°C por 1 min, denaturación a 94°C por 30 s, anillaje a 50°C por 1 min y extensión a 72°C por 30 s (40 ciclos) y una extensión final de 10 min a 72°C.

4.3.8 Identificación molecular de 16S rRNA para los aislados

Se amplificó a partir del DNA genómico de 15 aislamientos de BAL y 28 aislamientos de BFNS y 33 de actinomicetos (76 en total) la región completa del 16S rRNA (1.5 kb).

Los iniciadores utilizados para la amplificación de dichas regiones se presentan en la tabla 4-1. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µl por aislamiento, que contenían de 15 a 20 ng de DNA genómico, 20 mM tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,02 mg/ml BSA, 4 U *Taq* Polimerasa (Bioline®) y 10 pmol de cada iniciador, la concentración de MgCl₂ fue 1 mM por reacción. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 1 ciclo de 2 min a 95°C; 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 57°C y 1 min a 72°C; y una extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla 4-1: Iniciadores utilizados para la amplificación de la región 16S rRNA.

Blanco de identificación	Nombre del iniciador	Tamaño esperado	Secuencia
16S rRNA	27F	150pb	5´- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3´
	1492R		5´- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3´
	518F		5´- CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG -3´
	800R		5´- TAC CAG GGT ATC TAA TCC -3´

4.3.9 Secuenciación

Los DNAs amplificados fueron enviados a secuenciar a través de la Corporación CORPOGEN (enviado a MacroGen en Corea). El equipo utilizado fue un secuenciador automático 3730XL, la secuencia fue llevada a cabo bajo las condiciones del “BigDye™ terminator”. Las muestras fueron previamente purificadas por precipitación con etanol (protocolo CORPOGEN).

4.3.10 Análisis de las secuencias

Para el análisis de las secuencias, se realizó depuración manual de los datos basándose en la calidad del cromatograma, utilizando el programa “MEGA4” (Tamura, *et al.*, 2007), a partir de las secuencias previamente depuradas se ensamblaron *contigs* usando el programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). Estos *contigs* se evaluaron mediante la herramienta BLAST del NCBI sobre la base de datos no redundante de tal manera que se identificó la identidad de las secuencias (Altschul, *et al.*, 1997). Para corroborar la previa identificación, se compararon las secuencias contra “*Ribosomal Database Project*”.

Para realizar la reconstrucción filogenética de las secuencias obtenidas se partió de un alineamiento múltiple realizado con el algoritmo MUSCLE (Robert, 2004) en el programa CLC Workbench. La historia evolutiva fue inferida usando el método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), el porcentaje de réplicas de los árboles en el cual los taxones asociados fueron agrupados en el ensayo de *bootstrap* fue de 10,000 (Felsenstein, 1985), las distancias evolutivas fueron computadas usando el modelo de sustitución Kimura-2 parámetro (Kimura, 1980). Los análisis evolutivos se realizaron con MEGA4 (Tamura, *et al.*, 2007).

4.3.11 Análisis de diversidad microbiana

▪ Extracción de ADN y Pirosecuenciación

El ADN genómico total de cada una de las muestras de suelo fue extraído utilizando el *FastDNA@SPIN Kit for Soil* (Qbiogene, Carlsba – USA) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. El DNA fue cuantificado usando un espectrofotómetro (NanoDrop®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). El promedio de DNA obtenido por municipio fue de 37, 40 y 129 ng/μl para Dibulla, Curumaní y María la Baja, respectivamente; se realizó un pool a iguales concentraciones por municipio, las muestras fueron concentradas a 100 ng/μl y enviadas al *Research and Testing Laboratory* para efectos de secuenciación (Lubbock, Texas, USA).

Para la pirosecuenciación (bTEFAP; *Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing*), una alícuota de 100 ng (μl), de cada pool por municipio fue usada para 50 μl de reacción de PCR. Se utilizaron los iniciadores universales para eubacterias 530F (5′ -GTG CCA GCM GCN GCG G) y 1100R (5′ -GGG TTN CGN TCG TTG) que amplifican una región de 600 pb del gen 16S rRNA, una segunda PCR fue realizada para incorporar los enlazadores (*Linkers*) y las etiquetas (*Tags*) específicas para cada muestra

((a) Dowd, *et al.*, 2008).

▪ **Análisis de secuencias 16S rDNA**

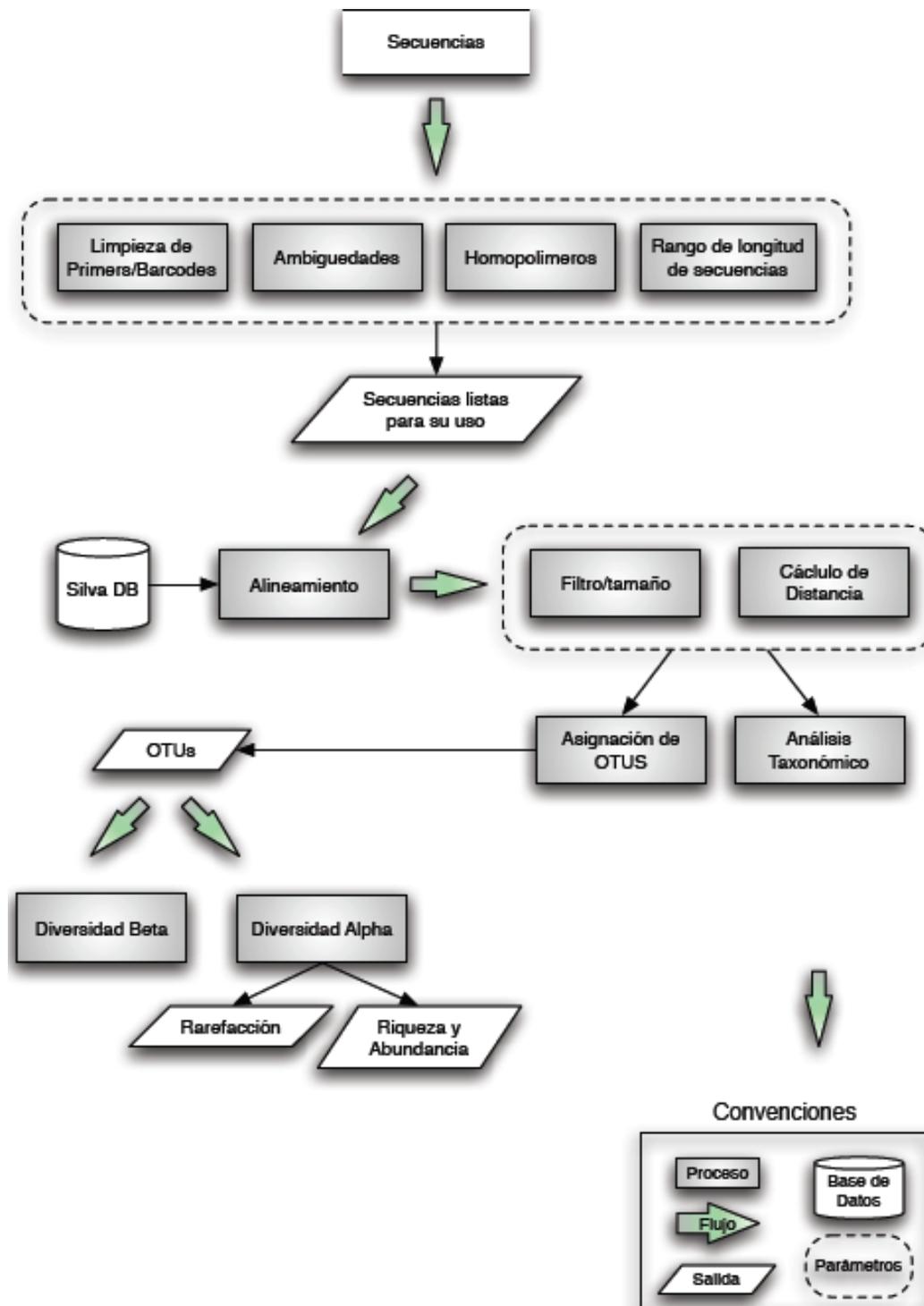
Las secuencias obtenidas fueron procesadas para limpiar los iniciadores y los tags adicionalmente se realizó una depuración descartando secuencias con bases ambigüas, homopolímeros y secuencias muy cortas (<50 pb).

A partir de las secuencias optimizadas se formaron *clusters* para obtener Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs, por sus siglas en inglés) definidos a un 3% de disimilaridad, con los que se calculó el esfuerzo de muestreo por medio de la curva de rarefacción, a demás se calcularon los estimadores de diversidad alfa (a saber: Chao1, ACE, Shannon no paramétrico) y la diversidad beta en función del estimador Chao1 y OTUs observados.

Se realizó la asignación taxonómica de OTUs llevando a cabo un alineamiento contra la base de datos SILVA para estimar los filotipos presentes en cada muestra.

Las secuencias restantes fueron alineadas con el programa MOTHUR, contra la base de datos SILVA para su clasificación taxonómica. Adicionalmente cada grupo de secuencias por municipio fueron agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) o filotipos, definidas a un 3% de disimilaridad en la secuencia de nucleótidos, a partir de las cuales se realizó la curva de rarefacción para comparar la riqueza relativa en los tres municipios. El estimador *Shannon* se utilizó para determinar el índice de diversidad y por medio de estimadores no paramétricos tales como ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*) y Chao1 (Chao and Bunge, 2002) se estimó la riqueza de los organismos en cada comunidad del suelo.

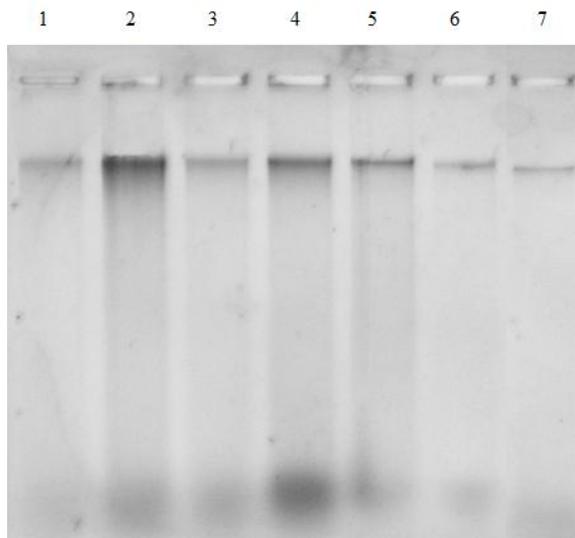
Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana



4.4 Resultados y Discusión

El DNA extraído de las BAL, BFNS y actinomicetos resultó de buena calidad, tal como se visualiza en la fotografía, las bandas de DNA se observan claramente y no hay degradación de las mismas 4-1.

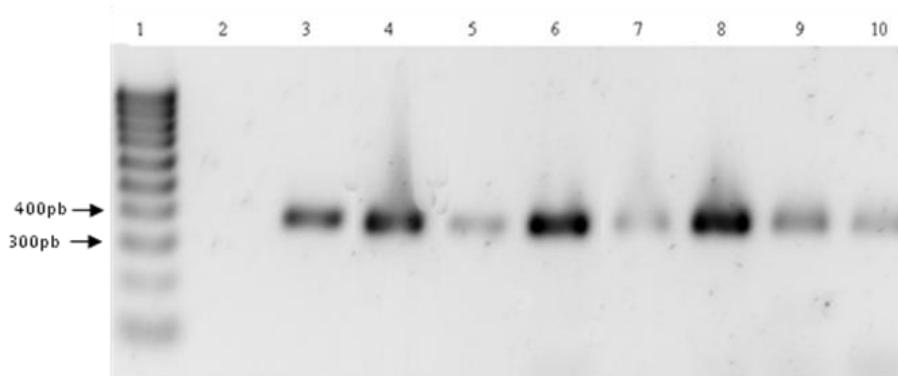
Fotografía 4-1: Extracción de DNA total de bacterias ácido lácticas (BAL), actinomicetos y bacterias fotosintéticas no sulfurosas (BFNS). Carril 1: Bacteria fotosintética (aislamiento 9DF); Carriles 2-5: actinomicetos (aislamientos 71BA, 72BA, 76BA, 78BA); Carriles 5-7: Bacterias ácido lácticas (aislamientos 40CB, 41CB).



4.4.1 Identificación molecular grupo funcional bacterias ácido lácticas

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó un amplicon de alrededor de 340 pb que reflejó el tamaño esperado para BAL con esta pareja de iniciadores (Allact-For y Allact-Rev) (fotografía 4-2). Por esta técnica se confirmó que los 15 aislamientos anteriormente caracterizados macro y microscópicamente pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas, que incluye microorganismos de géneros como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Leuconostoc*, entre otros. Sin embargo, en nuestro interés de detectar solo aislados del género *Lactobacillus*, en la sección 4.4.5 se presentan los resultados de la amplificación específica del 16S rRNA de los aislados del género *Lactobacillus*.

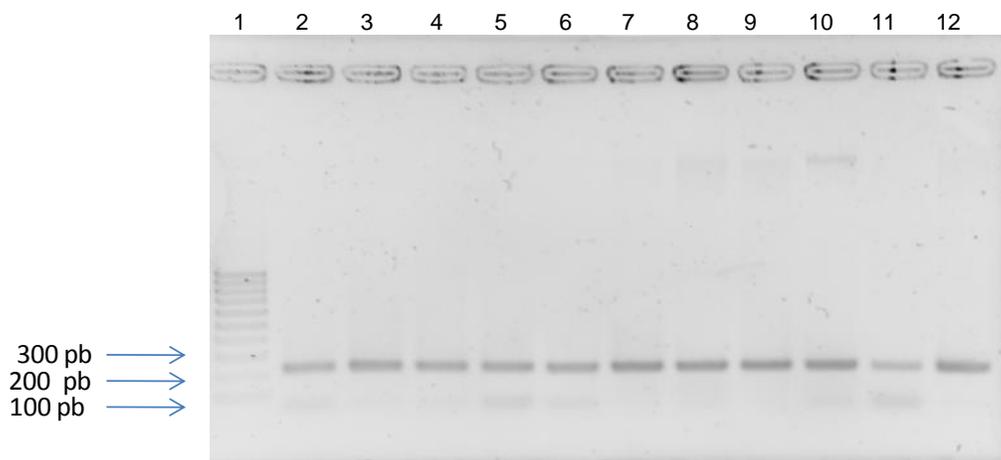
Fotografía 4-2: Amplificación de DNA de bacterias ácido lácticas utilizando iniciadores específicos. Carril 1: Marcador de peso molecular (Hyperladder V, BIOLINE); Carril 2: Control negativo; Carril 3: Control positivo (*L. plantarum*), Carriles 4-10: aislamientos 1 DB, 5DB, 18 DB, 19DB, 40CB, 44CB, y 61BB.



4.4.2 Identificación molecular grupo funcional bacterias fotosintéticas no sulfurosas

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que los 28 aislamientos de BFNS, presentaron la banda esperada de aproximadamente 229 pb. En la fotografía 4-3 se muestran algunos resultados representativos de las amplificaciones de DNA total de las BFNS. Estos resultados nos confirman que estos 28 aislamientos pertenecen al grupo de las bacterias fotosintéticas púrpuras sin embargo, la secuenciación del gen del 16S rRNA es el paso a seguir para identificar el género y/o especie a la que correspondan estos microorganismos. Dicha descripción se presentará más adelante en la sección 4.4.5.

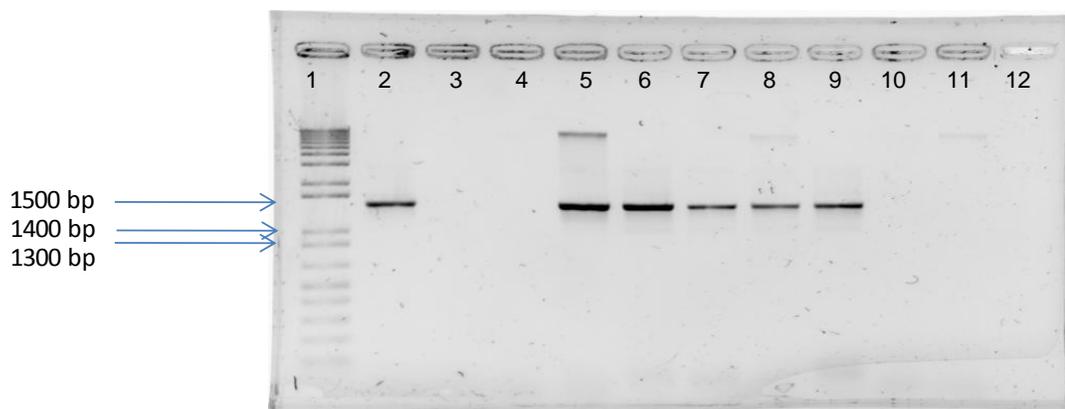
Fotografía 4-3: Amplificación de DNA de BFNS utilizando primers específicos. Carril 1: Marcador de peso molecular (Hyperladder V, BIOLINE); Carril 2-12: 22CF, 13CF, 14CF, 16CF, 17CF, 18CF, 20CF, 21CF, 30CF, 31CF, 35CF.



4.4.3 Identificación molecular grupo funcional actinomicetos

Los resultados obtenidos indican que 15 de los 33 aislamientos amplificaron con estos iniciadores sin embargo, tal y como se muestra en la fotografía 4-4 algunos de los actinomicetos aislados no amplificaron, esto posiblemente es debido a que los iniciadores no resultaron lo suficientemente efectivos para detectar actinos diversos genéticamente y diferentes a los utilizados por Cook & Meyers (2003), o que la PCR fue inhibida por la presencia de algunos de los pigmentos producidos por los actinomicetos.

Fotografía 4-4: Amplificación de DNA de actinomicetos utilizando primers F1 y R5 Carril 1: Marcador de peso molecular (Hyperladder V, BIOLINE); Carril 2: control positivo, Carril 3: control negativo, Carril 4-12: 2DA, 7DA, 20DA, 28DA, 30DA, 35CA, 36CA, 52CA y 57CA.



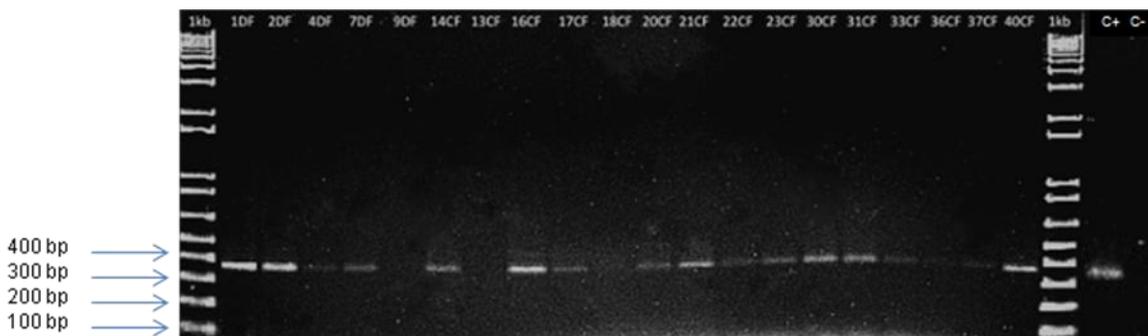
Aunque no se pudieron validar las condiciones de amplificación de actinomicetos utilizando esta pareja de iniciadores, el DNA de estos aislamientos fue amplificado con los iniciadores universales 27F y 1492R, para el gen ribosomal 16S rRNA y dichos resultados se presentan en la sección 4.4.5.

4.4.4 Identificación *nifH*

La capacidad de fijar nitrógeno está ampliamente distribuida entre diversos microorganismos tanto, quimiotrofos, fototrofos, autótrofos y heterótrofos. Quizá el marcador molecular más empleado en la detección de microorganismos fijadores de nitrógeno molecular, es el gen *nifH*. Este gen codifica para la nitrogenasa y ha evolucionado a la par con los genes 16S rRNA, por lo tanto también se utiliza como marcador molecular en estudios de filogenia (Bürgmann, *et al.*, 2004; Cantera, *et al.*, 2004).

Como resultado fue posible detectar la amplificación del gen en 25 de los 28 aislamientos de BFNS, mientras que en los actinomicetos se detectó en 15 de los 30 aislamientos. En la fotografía 4-5, se puede visualizar una banda correspondiente al fragmento con un tamaño esperado de 378 pb, en 17 de los 20 aislamientos de BFNS.

Fotografía 4-5: Amplificación del gen *nifH* de 378 pb, en los aislamientos 1DF, 2DF, 4DF, 7DF, 9DF, 14CF, 13CF, 16CF, 17CF, 18CF, 20CF, 21CF, 22CF, 23CF, 30CF, 31CF, 33CF, 36CF, 40CF, marcador de peso molecular, Control positivo, Control negativo.



Así como el gen *nifH* es seleccionado como marcador molecular (Sato, *et al.*, 2009) otros de los genes que conforman el complejo nitrogenasa pueden ser utilizados como indicadores de la fijación de nitrógeno, tal y como es el caso del gen *nifD* a pesar de ser menos conservado que *nifH* (Fedorov, *et al.*, 2008). La amplificación de estos genes, es de gran importancia debido a que la presencia de microorganismos capaces de fijar nitrógeno no siempre es detectable por medio de cultivos, por lo tanto se requiere de aproximaciones moleculares que demuestren la presencia de estas bacterias fijadoras de nitrógeno que a su vez estarían relacionadas con la productividad de los suelos.

Es de aclarar que la presencia del gen *nifH* no indica la fijación activa de nitrógeno, puesto que esta enzima presenta regulación pre y postranscripcional y su funcionamiento depende de las condiciones del medio ambiente (Bürgmann, *et al.*, 2004).

4.4.5 Análisis de las secuencias ribosomales del 16S rRNA de los aislados de tres grupos funcionales: BAL, BFNS y actinomicetos

Con el fin de complementar los resultados obtenidos en la selección previa (macro y microscópicamente y en las PCRs de identificación por grupo funcional); además de caracterizar los aislamientos, especialmente diferenciar entre los microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces*, los productos amplificados correspondientes al 16S rRNA de los aislamientos de actinomicetos fueron analizados por secuenciación.

A partir del análisis de las secuencias de los 11 aislados de BAL en la base de datos del NCBI se obtuvo un porcentaje de similitud de 99 ó 100 y con un índice de expectativa (Valor E) de cero. Siete de los 11 aislamientos secuenciados, presentaron alta similitud con *Lactobacillus plantarum* y de los otros cuatro aislamientos restantes, dos presentaron homología con *Enterococcus faecalis* y dos con *Enterococcus faecium*. Mientras tanto los análisis de las secuencias en la base RDP coincidieron con la identificación obtenida en NCBI para los *L. plantarum* sin embargo, los otros cuatro aislamientos presentaron una alta similitud con *Enterococcus faecium* (tabla 4-2).

Tabla 4-2: Comparación de secuencias de la región 16S rRNA de los aislamientos de BAL con la base de datos de NCBI y con la base de datos del RDP.

Aislamiento	NCBI	Valor E	Máxima identidad	RDP
1DB	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5DB	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6DB	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.0	98%	<i>Enterococcus faecium</i>
7DB	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.0	98%	<i>Enterococcus faecium</i>
9DB	<i>Enterococcus faecium</i>	0.0	99%	<i>Enterococcus faecium</i>
18DB	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
19DB	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
24DB	<i>Enterococcus faecium</i>	0.0	100%	<i>Enterococcus faecium</i>
40CB	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
44CB	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
61BB	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Lactobacillus ha sido aislado de diversas fuentes, entre ellas productos lácteos, carne, productos fermentados, vino y suelos. *L. plantarum* es una bacteria ácido láctica heterofermentativa, su importancia radica, entre otros, en la producción de bacteriocinas de clase II. Las bacteriocinas están codificadas en plásmidos o en el cromosoma y su expresión es regulada mediante el sistema de “*quorum-sensing*”. Estos péptidos son sintetizados ribosomalmente y muestran actividad antagónica contra especies estrechamente relacionadas o de diferentes géneros, algunos de ellos son especies patógenas para las plantas, animales o el hombre (Coolborn, 2005; Aguilar, *et al.*, 2009; Knoll, 2007).

El hallazgo de *L. plantarum* en los suelos aquí estudiados, es de gran importancia, puesto que este microorganismo ha sido reportado como antagonista de *Salmonella*, *S. aureus*, *Pseudomonas*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris* y *E. coli* (Estrada, *et al.*, 2005; Cadirci & Citak, 2005), adicionalmente se ha reportado que plantas de frijol tratadas con bacterias ácido lácticas antes de la inoculación con *P. syringae* mostraron pocos síntomas que aquellas que no fueron tratadas (Visser, *et al.*, 1986). En este contexto la presencia de BAL en suelo podría sugerir una alta actividad antagónica contra bacterias patógenas y adicionalmente una fuente natural de solubilización de fosfatos, que en términos productivos podría traducirse en una reducción de costos y de uso de fertilizantes de origen químico.

En este estudio también se encontró una alta similitud de las secuencias de los *Lactobacillus* aislados con *Enterococcus*, los cuales hacen parte de las bacterias ácido lácticas y han sido previamente aisladas de suelo y aún en mayor proporción que los *Lactobacillus* (Yanagida, *et al.*, 2005). Estos microorganismos morfológicamente catalogados como cocos o cocobacilos, catalasa negativos, han sido reportados como productores de bacteriocinas altamente estables (enterocinas), con actividad contra *Listeria monocytogenes*, por lo que han sido ampliamente usados en la conservación de alimentos (Aguilar, *et al.*, 2009).

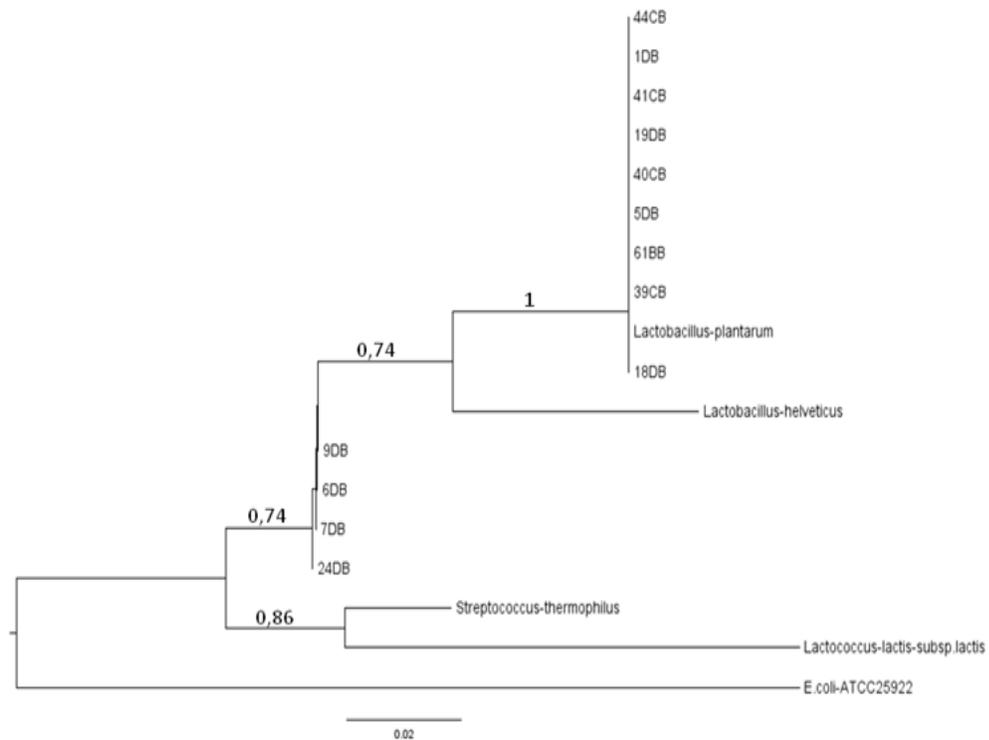
Los *Enterococcus* también producen patologías en humanos y recientemente se les relaciona con infecciones nosocomiales por su capacidad para adquirir una amplia variedad de factores de resistencia a los antimicrobianos. El incremento en dicha resistencia representa serios problemas en el manejo de pacientes con infecciones causadas por este microorganismo (Lombardo-Aburto, *et al.*, 2010; Causse, *et al.*, 2006). Los *Enterococcus* hacen parte de la flora normal del intestino de animales y aves y generalmente han sido aislados de agua, cuando ha sido contaminada con materia fecal (Díaz, *et al.*, 2010).

La presencia de bacterias como *Enterococcus* en los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja puede deberse a que los pequeños productores de estos municipios durante el proceso de preparación de abonos (bioles y bokashis), utilizan materias primas entre las que están la materia fecal proveniente de animales. Ya que los *Enterococcus* hacen parte de la flora normal de animales, no es raro encontrarlos en el suelo, sitio donde se aplican los abonos orgánicos (bioles y bokashis). Sin embargo, a pesar de ser reconocidos como productores de bacteriocinas, estos microorganismos deben ser excluidos de una posible utilización como inoculantes bacterianos, puesto que pueden causar patologías para el ser humano y disminuir la calidad e inocuidad de los productos agrícolas.

El árbol filogenético (figura 4-1), se construyó a partir de las secuencias de nucleótidos del 16S rRNA y se incluyeron tres secuencias de bacterias ácido lácticas de referencia (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus*), con el fin de evaluar la relación de las secuencias investigadas. En este árbol la secuencia de la cepa ATCC 25922 de *E.coli* fue usada como grupo externo y está localizada en una rama inferior distante filogenéticamente de las cepas analizadas.

Se observan tres clados diferentes, todos los aislamientos identificados aquí como *Lactobacillus plantarum* se agruparon en un mismo clado y se encuentran bien soportados junto a la secuencia de referencia *L. plantarum* ATCC14917. En el segundo clado se organizaron las secuencias de los *Enterococcus* y en el tercer clado se organizaron las otras dos secuencias de bacterias ácido lácticas. Por último en una rama externa se observa la *E. coli* utilizada como grupo externo.

Figura 4-1: Análisis filogenéticos de aislados de BAL basados en las secuencia nucleotídicas de 16S rRNA.



De los 28 aislamientos de BFNS, 26 fueron secuenciados. A partir del análisis de las secuencias en la base de datos del NCBI, los aislamientos de BFNS presentaron en su totalidad, alta similitud con *Rhodopseudomonas palustris* con un porcentaje de similitud de 99 ó 100 y con un índice de expectativa (valor E) de cero (tabla 4-3), esto sin importar el municipio de procedencia o la muestra. Estos resultados coinciden en su mayoría con los encontrados al comparar las secuencias con la base de datos RDP.

Tabla 4-3: Comparación de secuencias de la región 16S rRNA de los aislamientos de BFNS con las bases de datos NCBI y RDP, se muestra el valor E y el porcentaje de identidad reportada por NCBI.

Aislamiento	NCBI	Valor E	Maxima identidad	RDP
1DF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
2DF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
4DF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
7DF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
9DF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
13CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
14CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
16CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
17CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>

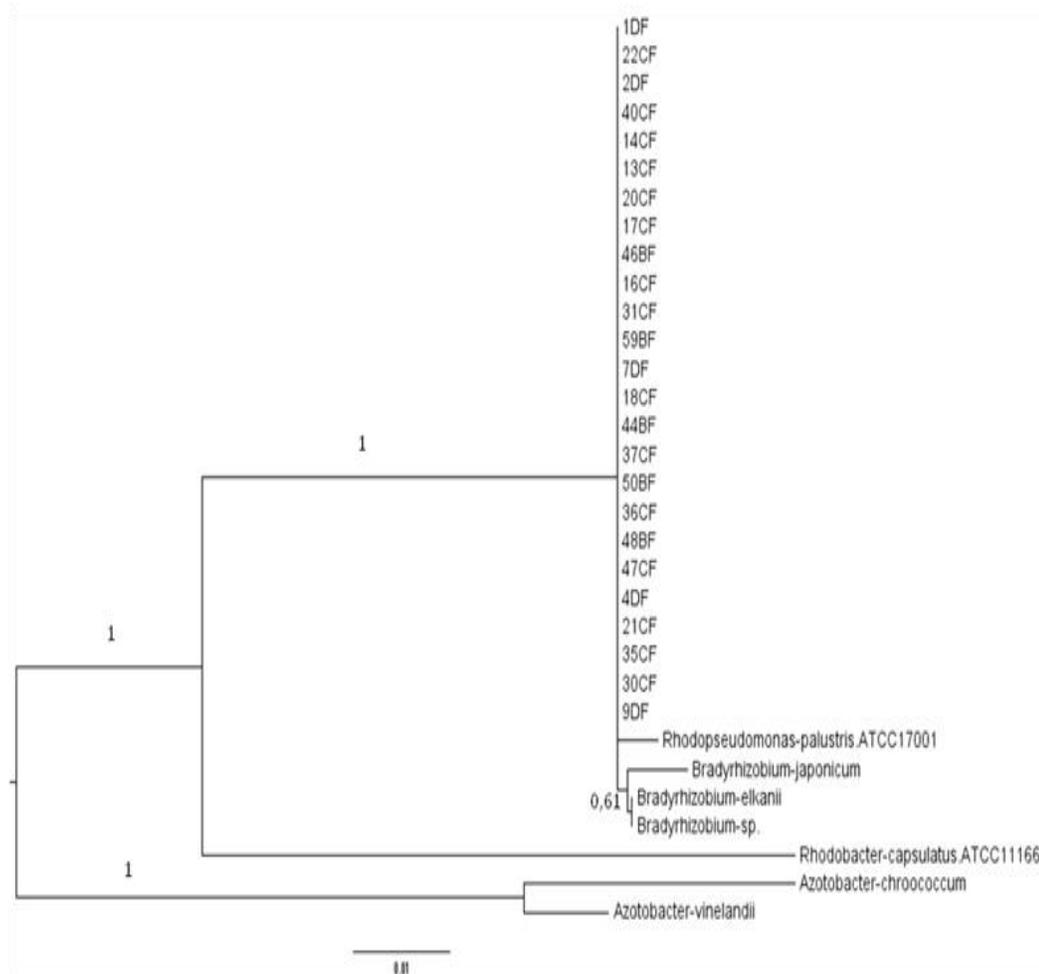
Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

18CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
20CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
21CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
22CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
30CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
31CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
35CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
36CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
37CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
40CF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
44BF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
46BF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
47BF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
48BF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
50BF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
56BF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	100%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
59BF	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	0.0	99%	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>

R. palustris es una bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa; según análisis filogenéticos de secuencias del 16S rRNA están estrechamente relacionadas a bacterias formadoras de nódulos no fotosintéticas como lo es el *Bradyrhizobium japonicum* y a otros rizobios fototróficos (figura 4-2). El árbol filogenético, fue construido a partir de las secuencias de nucleótidos del 16S rRNA de los aislamientos de BFNS obtenidos en este trabajo, adicionalmente, fueron incluidas seis secuencias de bacterias de referencia: fotosintéticas, formadoras de nódulos, no fotosintéticas ó formadoras de nódulos de lento crecimiento, como lo son *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium sp.*, finalmente se utilizaron las secuencias de *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* como grupo externo.

Todos los aislamientos aquí estudiados e identificados como *Rhodopseudomonas palustris* por medio de las bases de datos del NCBI se agruparon en un mismo *cluster*, junto a la cepa *R. palustris* ATCC 17001 utilizada como referencia, soportadas con 1% de *bootstrap*. Se observó una cercanía con las secuencias de *Bradyrhizobium* y aunque los *Rhodobacter* son fotosintéticas no sulfurosas, se localizan en una rama diferente al de las *Rhodopseudomonas*. En una rama externa tenemos en el grupo externo los aislados de *Azotobacter*.

Figura 4-2: Análisis filogenéticos de secuencia nucleotídica de 16S rRNA de aislados de BFNS.



Rhodopseudomonas se encuentra ubicada dentro de la clase *alfaproteobacteria*, han sido aisladas de diversos ambientes y en especial de suelos de cultivos de arroz en el Japón, Egipto, Tailandia y en el sudeste de Asia (Harada, 2003). Puede degradar y reciclar componentes de la madera, por lo cual se encuentra relacionado al ciclo del carbono, adicionalmente es capaz de producir electricidad utilizando una diversidad de sustratos (Xing, *et al.*, 2008); son conocidas como las bacterias más versátiles metabólicamente hablando, ya que pueden usar la luz, además de compuestos orgánicos e inorgánicos para obtener energía. Por muchas de estas características descritas estos microorganismos son usados para el tratamiento de aguas de desecho agrícolas y de acuarios (Larimer, *et al.*, 2004; Kim, *et al.*, 2004).

Rhodopseudomonas crece fotoheterotróficamente en presencia de luz; al ser ácido tolerantes pueden crecer en ambientes moderadamente ácidos preferiblemente fangos o suelos húmedos de climas moderados (LaClair, 2006), como los de los suelos de los tres municipios aquí muestreados. Adicionalmente *Rhodopseudomonas sp.* es capaz de fijar CO_2 y N_2 (Larimer, *et al.*, 2004; Kim, *et al.*, 2004). El hecho de que las BFNS en especial *R. palustris* sea reconocido como fijador de nitrógeno es de gran importancia puesto que es una alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados que contribuyen a la emisión de

gases invernadero, erosión y aumento de los costos en la producción de los cultivos (Bhattacharjee, *et al.*, 2008).

Estos microorganismos por su capacidad para fijar nitrógeno tienen gran potencial en la explotación agrícola ya que originan altos rendimientos en cosechas de diferentes cultivos como arroz, maíz, frijol, tomate, entre otros (Mantilla, *et al.*, 2007). En Colombia sería de gran importancia conocer estas poblaciones nativas de *R. palustris* y determinar su capacidad para fijar nitrógeno, ya que podría permitir el aprovechamiento de un recurso propio como lo es el de las poblaciones microbianas como inoculantes para mejorar la productividad y promover la reducción o sustitución de fertilizantes de origen químico.

En el último grupo de microorganismos, el de los actinomicetos, se secuenciaron 20 aislamientos. Luego del análisis de las secuencias en la base de datos del NCBI, nueve de 20 (45%) aislamientos secuenciados presentaron alta similaridad con *Streptomyces ansochromogenes*, 2 (10%) con *S. tubercidicus*, cada uno del resto de aislamientos presentó una alta similaridad con una especie diferente de *Streptomyces*, tal y como se observa en la tabla 4-4. Estos resultados fueron obtenidos con un porcentaje de similaridad de 99 ó 100 y con un índice de expectativa (valor E) de cero con la base de datos del NCBI.

En cuanto a los resultados obtenidos en la base de datos RDP, aquellos aislamientos que aparecen con una alta similaridad con *S. ansochromogenes*, en esta base su alta similaridad es con *S. nogalater*. En contraste, algunos aislamientos coinciden en sus resultados de identidad independientemente de la base de datos utilizada. Este es el caso de los aislamientos 7DA (*Streptomyces bikiniensis*), 20DA (*Streptomyces griseorubiginosus*), 41CA (*Streptomyces diastatochromogenes*), 42CA (*Streptomyces hygroscopicus*) 46CA (*Streptomyces tubercidicus*) y 64CA (*Streptomyces albus*) (tabla 4-4).

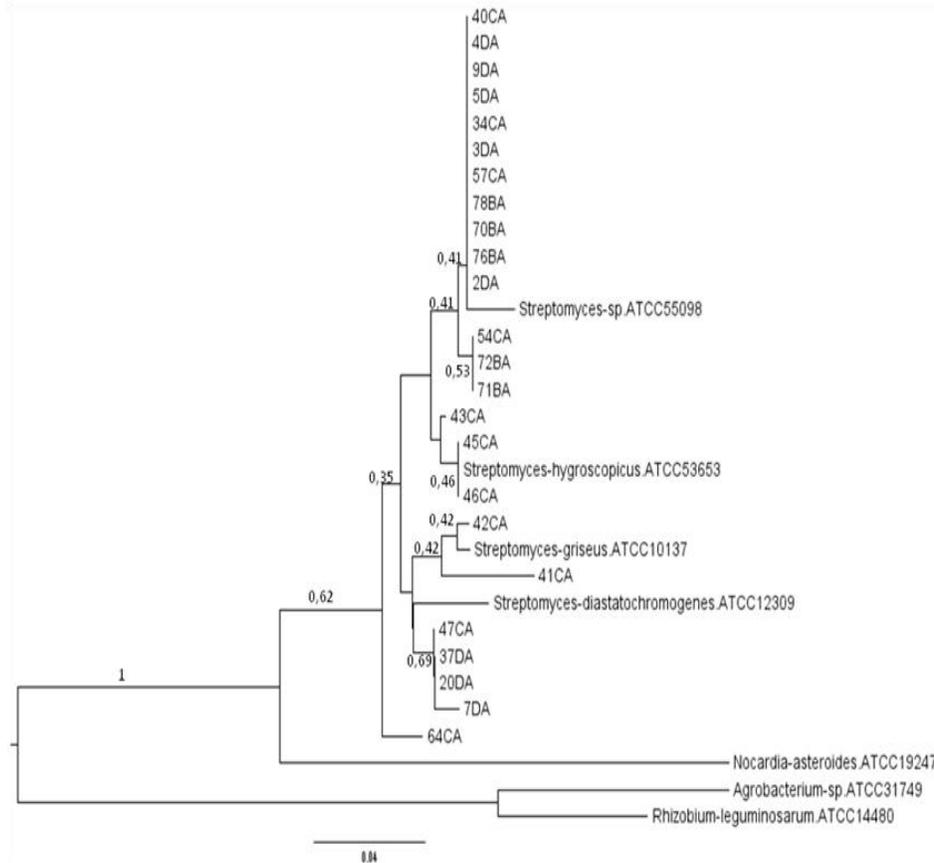
Tabla 4-4: Comparación de secuencias de la región 16S rRNA de los aislamientos de actinomicetos con la bases de datos NCBI y RDP.

Aislamiento	NCBI	Valor E	Máxima identidad	RDP
2DA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>
3DA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>
4DA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>
5DA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>
7DA	<i>Streptomyces bikiniensis</i>	0.0	99%	<i>S. bikiniensis</i>
9DA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>
20DA	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	0.0	99%	<i>S. griseorubiginosus</i>
40CA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>
41CA	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	0.0	99%	<i>S. diastatochromogenes</i>
42CA	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	0.0	99%	<i>S. hygroscopicus</i>

43CA	<i>Streptomyces naganishii</i>	0.0	99%	<i>S. panayensis</i>
45CA	<i>Streptomyces tubercidicus</i>	0.0	99%	<i>S. catenulae</i>
46CA	<i>Streptomyces tubercidicus</i>	0.0	99%	<i>S. tubercidius</i>
47CA	<i>Streptomyces panayensis</i>	0.0	99%	<i>S. phaeopurpureus</i>
48CA	<i>Streptomyces achromogenes</i>	0	99%	<i>S. capoamus</i>
57CA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>
64CA	<i>Streptomyces albus</i>	0.0	99%	<i>S. albus</i>
72BA	<i>Streptomyces albogriseus</i>	0.0	100%	<i>S. paradoxus</i>
76BA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>Streptomyces</i>
78BA	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	0.0	100%	<i>S. nogalater</i>

Para la construcción del árbol filogenético de los actinomicetos se utilizaron las 20 secuencias obtenidas del gen 16S del rRNA, así como de 4 aislamientos de *Streptomyces* ATCC de referencia (*Streptomyces sp.*, *S. hygroscopicus*, *S. griseus* y *S. diastochromogenes*) obtenidas de la base de datos del NCBI. De igual forma también se incluyó una secuencia de *Nocardia asteroides* que pertenece al filum de las actinobacterias al igual que los actinomicetos. Como grupo externo se utilizaron las secuencias de un *Agrobacterium sp* y un *Rhizobium leguminosarum*. Con estas secuencias se formaron 3 clados completamente diferenciados y bien soportados, el primero el de los *Streptomyces*, en el siguiente clado encontramos *Nocardia* y en el último los microorganismos nóduladores, más distantes filogenéticamente. La situación taxonómica dentro del grupo de los *Streptomyces* es bien compleja y no se encuentra resuelta del todo (Suutari, *et al.*, 2002), es así que cepas estrechamente relacionadas filogenéticamente pueden presentar diversidad fisiológica, morfológica y química, esto se demuestra por los análisis de *bootstrap*, cuyos valores están muy bajos entre los diferentes nodos de las ramas como para poder diferenciar entre especies dentro de los aislados de *Streptomyces* (figura 4-3).

Figura 4-3: Análisis filogenéticos de aislados de actinomicetos basados en las secuencia nucleotídicas de 16S rRNA.



Los *Streptomyces* son bacterias del suelo con un ciclo de vida complejo, pasando de un micelio de sustrato a tener un micelio aéreo; son reconocidos por su capacidad de degradar compuestos orgánicos complejos, como almidón, pectina y caseína, razón por la cual son capaces de crecer sobre una gran cantidad de fuentes de carbono. Adicionalmente son reconocidos por su capacidad para producir metabolitos secundarios, que se relacionan con la diferenciación celular (Suutari, *et al.*, 2002).

La producción de dichos metabolitos, como los antibióticos, involucra la expresión de genes que se encuentran organizados en clado. Uno de estos antibióticos es producido por *S. ansochromogenes* (aislado de los tres municipios) y se denomina *nikomicina*, el cual es usado como agente antifúngico en la agricultura y en terapia humana. La *nikomicina* se conoce como un inhibidor competitivo de la quitina sintetasa, por lo que posee una fuerte actividad contra hongos fitopatógenos, patógenos de humanos, insectos y ácaros. La *nikomicina* no es tóxica para animales, plantas y abejas y se puede degradar fácilmente, en la naturaleza se han reportado *S. ansochromogenes* aislados de suelos en el noroeste de China productores de *nikomicina* (Liu, *et al.*, 2005; Jia, *et al.*, 2000; Jia, *et al.*, 2007), sin embargo no quiere decir que los *S. ansochromogenes* aquí aislados posean la misma propiedad.

S. tubercidicus, otro de los aislamientos aquí identificados en el suelo del municipio de Curumaní, se conoce como productor de una endonucleasa (*Stul*), la cual reconoce una secuencia palindrómica hexanucleotídica (Hidenori, *et al.*, 1980). Adicionalmente, se conoce este microorganismo como productor de sustancias inmunosupresoras utilizadas en trasplantes, tal es el caso de la FK520 (ascomicina), la rapamicina (Kónya, *et al.*, 2008) y la tubercidina (Cheol, *et al.*, 1984). Finalmente este actinomiceto ha sido recientemente reportado como aislado de manglares en la India, más específicamente en Bhitarkanika (Gupta, *et al.*, 2009).

S. bikiniensis, aquí detectado en el suelo de Dibulla es reconocido por la producción de un macrólido la “chalconomicina”, un antibiótico utilizado tanto en humanos como en medicina veterinaria, presenta gran actividad contra bacterias Gram positivas especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* y algunas especies de Mycoplasmas. Se sabe que es un inhibidor de la síntesis de proteínas, pero su mecanismo preciso de acción no ha sido descrito todavía (Ward, *et al.*, 2004).

S. hygrosopicus, aislado del suelo de Curumaní produce un aminoglicósido “higromicina”, que presenta una actividad intermedia frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y algunas espiroquetas, aunque también se le ha relacionado como un medicamento inmunosupresor; es mucho más potente que el cloranfenicol y se une fuertemente al ribosoma para inhibir la síntesis de proteínas (Habib, *et al.*, 2003). *S. hygrosopicus* también produce un compuesto que posee citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer (Zhang, *et al.*, 2010).

4.4.6 Análisis de diversidad microbiana

En los análisis realizados se estimó y se comparó la composición de las comunidades bacterianas presentes en los suelos de los diferentes municipios, al igual que la abundancia de algunas taxás particulares. A partir de las 3 muestras de suelo se recuperaron en total 55.438 secuencias, con una longitud promedio de 157 pb. El número de secuencias por municipio varió de 9.390 a 11.179, con un promedio de 10.449 secuencias por municipio, de las cuales 31348 fueron clasificadas hasta el nivel de familia (56.5%).

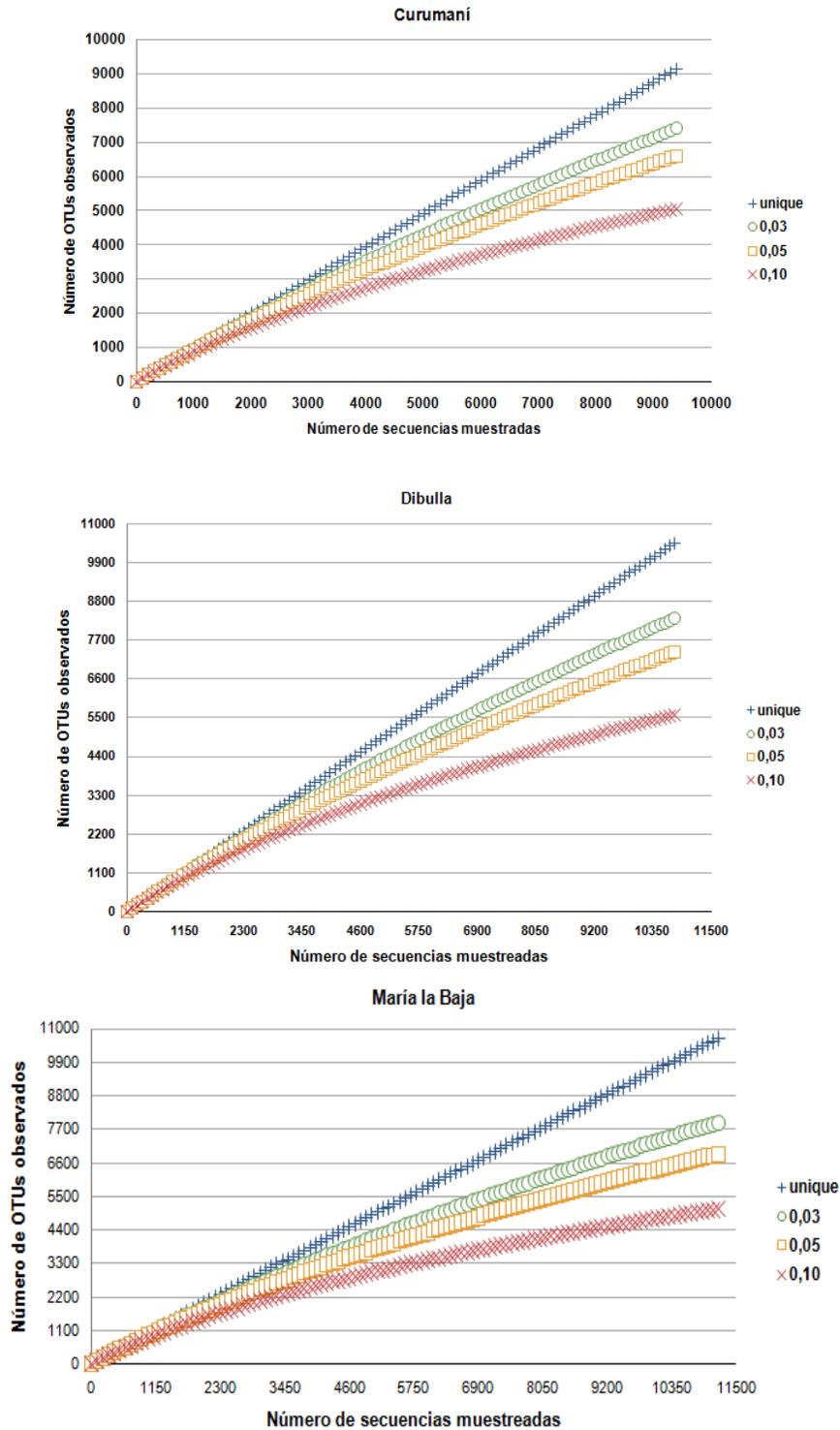
Riqueza y abundancia bacteriana e índices de diversidad

La diversidad microbiana presente en estos suelos fue calculada mediante la estimación de los índices de Chao y de Shannon. Esta riqueza y diversidad de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) se establecieron a un 0%, 3%, 5% y 10% de disimilaridad entre secuencias, para cada uno de los municipios. Un 0% de disimilaridad significa que se considera cada secuencia como un OTU, es decir singletones, a un 5% de disimilaridad se crean grupos con disimilaridad tal que encierran secuencias que pertenecen a organismos del mismo género para 16S y a un 3% de disimilaridad se obtiene un agrupamiento a nivel de especies (Dowd *et al.*, 2008).

Los análisis de rarefacción en los 3 niveles de distancia genética mostraron que ninguna de las curvas alcanzó la saturación (figura 4-4) lo que sugiere que la diversidad taxonómica a ninguna de estas distancias filogenéticas se cubrió completamente, es decir que el muestreo fue insuficiente para captar la diversidad de la comunidad microbiana en cada municipio muestreado.

Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

Figura 4-4: Curvas de rarefacción, describen si el cubrimiento que se obtuvo con el muestreo es suficiente.



En el estudio llevado a cabo, el número de OTUs estimados es mayor a medida que se aumenta el número de secuencias. A un nivel de 3% de disimilaridad, el máximo número de OTUs, en cualquiera de los tres suelos se encuentra por debajo de 8311.

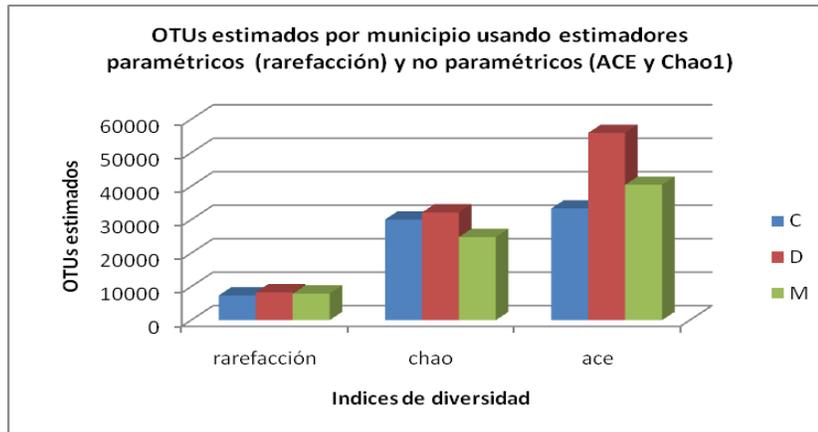
Con el fin de realizar el análisis a nivel de especie se consideró trabajar con OTUs formados a 0,03 de distancia (97% de identidad entre las secuencias del OTU). Por lo tanto el número de secuencias utilizadas en los análisis fue de 7.403 en el municipio de Curumani, 8.311 en Dibulla y 7.927 en María la Baja (figura 4-5).

Para estimar el valor máximo en cualquier nivel filogenético se hace necesario extrapolar en la curva de rarefacción o usar métodos no paramétricos para estimar la riqueza de OTUs dentro de la estructura de una población (Roesch, *et al.*, 2007), estos métodos no paramétricos otorgan estimativos que varían de acuerdo al tamaño de la muestra. A 0% de disimilaridad (“unique”) los estimadores no paramétricos ACE y Chao1 sobre estimaron el número de especies mientras en las curvas de rarefacción desestimaron el número de especies (tabla 4-5)

Tabla 4-5: Estimativo de la riqueza de especies obtenidas a una distancia genética de 0 (“unique”), 3, 5 y 10%.

	Disimilaridad	OTUs observados	Chao	ACE
Curumani	unique	9132	227648	241449
	0,030	7403	30067	33364
	0,050	6601	21697	37052
	0,100	5062	11644	18208
Dibulla	unique	10433	233799	265624
	0,030	8311	32192	55948
	0,050	7354	22804	38066
	0,100	5572	12563	18950
María la Baja	unique	10678	170906	190832
	0,030	7927	24818	40439
	0,050	6887	17627	28572
	0,100	5094	10305	15347

Figura 4-5: Estimativo de la riqueza de especies obtenidas a una distancia genética de 3% de disimilaridad.

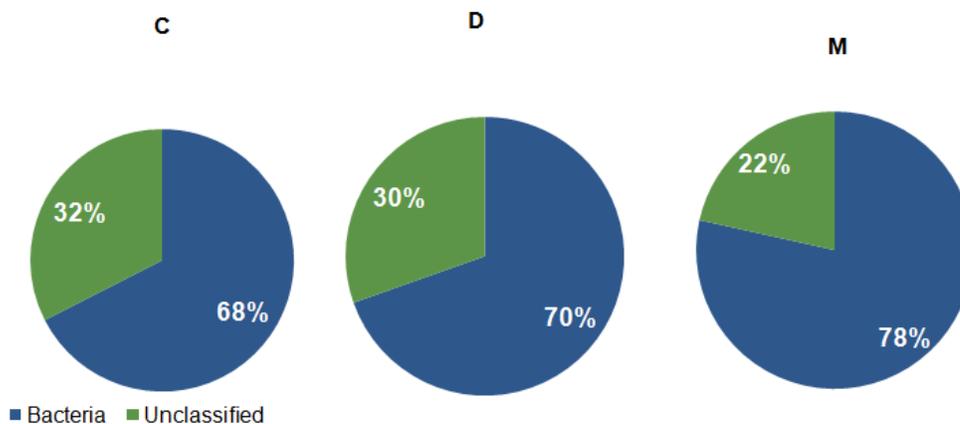


El índice de diversidad de Shannon (H) fue determinado para todas las muestras a una distancia genética de 3%. El rango varió entre 9.5 para María la Baja, a 9.8 en Dibulla, esto quiere decir que la mayor diversidad bacteriana fue ubicada en el municipio de Dibulla, seguido por María la Baja y en último lugar el municipio de Curumaní.

Análisis taxonómico de las comunidades

La asignación taxonómica realizada usando la base de datos SILVA, dio como resultado que el 72% de las secuencias correspondían a microorganismos no clasificados y el 28% restante a bacterias (figura 4-6)

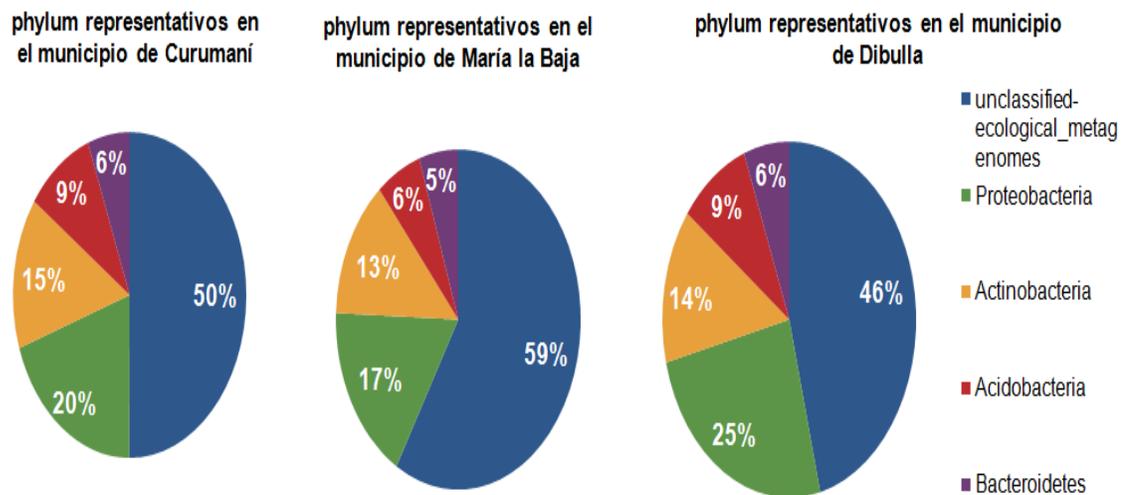
Figura 4-6: Distribución porcentual de las secuencias clasificadas como bacterias y las no clasificadas



Del total de secuencias clasificadas dentro de bacterias el 20% correspondieron a Proteobacterias, que representaron el *phylum* dominante en cada municipio, donde las

alfaproteobacterias fueron la clase dominante en cada suelo excepto en el de María la Baja donde lo fueron las betaproteobacterias (figura 4-7).

Figura 4-7: Distribución de cada uno de los *Phylum* representativos en cada municipio



No es sorprendente encontrar a las proteobacterias como el *phylum* dominante, ya que ellas incluyen las alfa, beta y gamma proteobacterias, este resultado es similar a lo descrito por Roesch (2007), donde las betaproteobacterias fueron la clase dominante, excepto para el suelo de Brasil donde lo fueron las gammaproteobacterias. En contraste en nuestro estudio las alfaproteobacterias fueron la clase dominante excepto para el municipio de María la Baja, donde lo fueron las betaproteobacterias; este *phylum* agrupa un gran número de bacterias asociadas al ciclo del nitrógeno, que se podrían relacionar con la cantidad de materia orgánica detectada en los suelos de los diferentes municipios.

El segundo *phylum* más dominante fue el de las Actinobacterias, seguido por las Acidobacterias y los Bacterioidetes, estos resultados son comparables a los presentados por Feinstein (2009) donde indican que estos dos *phylum* son representativos de microorganismos cultivables del suelo. Cabe recordar acerca de los sesgos originados por el uso de metodologías de microbiología clásica (cultivables) donde frecuentemente solo se logra aislar e identificar aquellas especies que pueden crecer en un medio de cultivo. Sin embargo, Feinstein y colaboradores también señalan que en estudios donde solo se utilizan métodos moleculares también se podrían presentar sesgos debido a errores en la extracción de ADN, ya que no se logra extraer una cantidad considerable de ADN en un procedimiento de extracción común. Otros factores que podrían incluir sesgos en las aproximaciones de tipo molecular incluyen: el número de copias ribosomales, la composición y tipo de comunidad bacterianas presentes, la presencia de inhibidores de la PCR en suelo, el tipo de región variable ribosomal seleccionada, el grado de especificidad y cobertura de los iniciadores, entre otros.

Estos resultados que coinciden con los de Roesch (2007), señalan que las proteobacterias son el *phylum* dominante, sin embargo no coinciden con el resultado de este estudio, ya que Roesch y cols reportan que el segundo *phylum* más dominante fue el de las acidobacterias, seguidas por las actinobacterias y posteriormente por los

firmites. Roesch y cols encontraron en este lugar a las acidobacterias, en tercer lugar las actinobacterias y en el cuarto a los firmites; finalmente estos dos estudios coinciden en la existencia de otros phylum de interés como lo son, Verrucomicrobia, Chloflexi, Nitrospira, Cianobacterias y WSE.

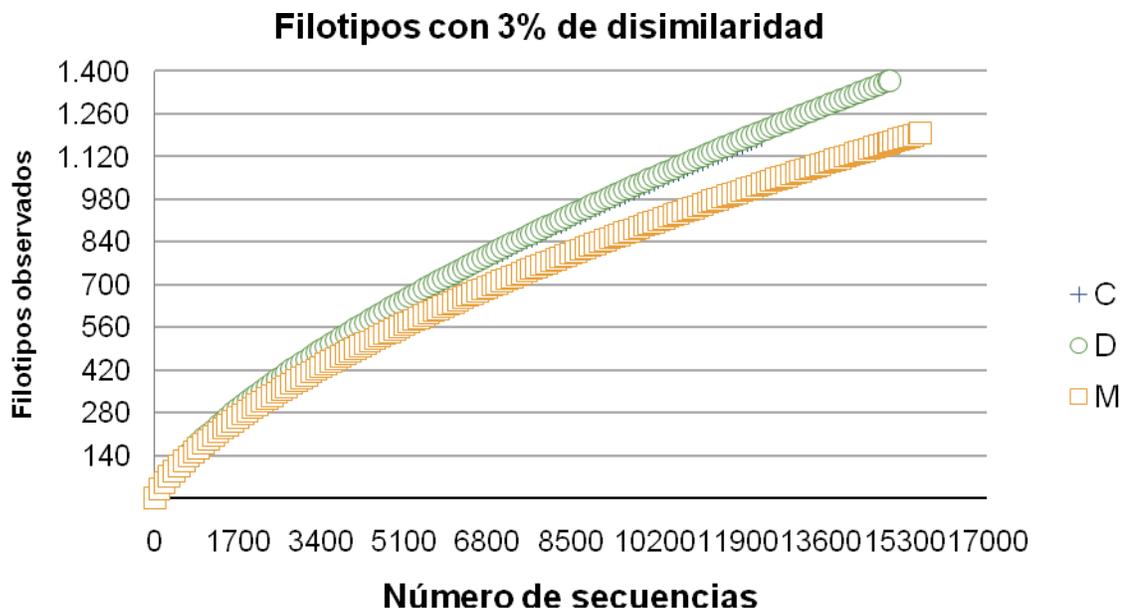
Los resultados obtenidos difieren de los obtenidos por Will (2010), en su estudio realizado sobre composición bacteriana en diferentes horizontes de suelo de pradera, ya que el *phylum* dominante reportado por estos investigadores fue el de acidobacterias para los dos horizontes en las diferentes muestras estudiadas, en el estudio aquí realizado se reportan las acidobacterias en tercer lugar luego de las proteobacterias y las actinobacterias. Will sugiere que debido a la abundancia en la presencia de acidobacterias en diversos tipos de suelos ellas estarían involucradas en un importante papel en el funcionamiento de la ecología de los suelos.

A pesar que los resultados de este estudio no coinciden con los de Will en cuanto al reporte de las acidobacterias en primer lugar de *phylum*, si comparamos la abundancia de los diferentes grupos dentro de las acidobacterias, ambos estudios coinciden en que, el subgrupo 6 es el más abundante seguido del subgrupo 4. Esta coincidencia de resultados a nivel de subgrupo 6 se dio para los dos horizontes muestreados por Will y para los tres municipios aquí estudiados. Jones (2009) describió en un amplio número de suelos recolectados tanto en norte como en sur América específicamente en los picos de las estaciones de crecimiento de plantas, a nivel de subgrupo (*phylum* acidobacterias) un orden de abundancia descendente de 4, 1, 2, 3 y 6.

Adicionalmente estudios realizados por Hansel (2008) detectaron como subgrupos dominantes el 3, 4 y 6 en el horizonte A y los subgrupos 4, 5 y 7 en el horizonte B para acidobacterias. Aunque en el estudio aquí realizado no se consideró la diversidad microbiana por horizonte, los subgrupos 6, 4, 5 y 1 fueron los más abundantes dentro de las acidobacterias, lo que es comparable a los hallazgos de los autores citados. Las diferencias en los subgrupos entre los diferentes estudios puede ser debida a los valores de pH de las muestras. Los suelos aquí estudiados presentaron valores de 5,5 a 7,3 que abarcan los rangos de pH obtenidos por los dos investigadores en sus suelos; Will (2010) y Jones (2009) habían reportado que la abundancia del *phylum* de las acidobacterias se correlaciona con el pH del suelo, a pH bajos se encuentra mayor abundancia, algo que no es exclusivo para las acidobacterias también se encontró una correlación significativa para la abundancia de la alfaproteobacterias, bacteroidetes flavobacterias y OP10 (Jones, *et al.*, 2009).

En el estudio realizado por Jones (2009), se relacionó la filodiversidad con las características del suelo y describieron que esta no se correlaciona con ninguna de las características ambientales medidas, por lo tanto sugiere que las características de los suelos no restringen o amplifican la cantidad de diversidad contenida en una comunidad acidobacteriana dada; En la figura 4-8, se presenta una curva de rarefacción en cuanto a filotipos.

Figura 4-8: Curva de rarefacción, considera OTUs a un 3% de disimilaridad asignados a un filotipo determinado.



No obstante el elevado número de secuencias obtenidas (figura 4-8), con base en los estimadores Chao1 y ACE, aún no se puede estimar la riqueza total de estos suelos y menos a nivel de especie, ya que a mayor número de muestras probablemente se logre identificar más taxas que pueden estar presentes en baja abundancia. Sin embargo, estos resultados permiten un entendimiento de las diferentes comunidades microbianas presentes en los suelos estudiados, sugiriendo posibles vías por las cuales ellas pueden contribuir a la productividad y salud de la planta (Dowd, *et al.*, 2008).

Los métodos basados en la técnica de cultivo tradicional tienen el gran inconveniente de que permiten el crecimiento solo de aquellos microorganismos que puedan crecer fácilmente en ellos (Dowd, *et al.*, 2008). Otros métodos utilizados en diversidad microbiana como DGGE y RFLP, no abordan la identidad a nivel de género y especie, pero dan un perfil cualitativo (huella) del tipo y abundancia de comunidades presentes. Mientras que la pirosecuenciación busca la recuperación de las secuencias de microorganismos tanto cultivables como no cultivables, haciendo una estimación del número de especies lo que permite dilucidar el panorama general de la presencia de organismos y sus funciones metabólicas.

Diversidad Cultivable vs No Cultivable

Los resultados reportados en el capítulo 2 de organismos cultivables se asemejan a los encontrados aquí por pirosecuenciación. El grupo funcional revelado por pirosecuenciación, actinomicetos, pertenecientes al *phylum* de las actinobacterias, también fueron recuperados por métodos de cultivo tradicional (anexo C). Sin embargo BAL como *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* (*phylum* firmicutes), que fueron recuperados en cultivo, no aparecieron en los filotipos revelados por pirosecuenciación. Caso similar aconteció para el orden de los rizobiales, donde

pirosecuenciación mostró abundantes a géneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Rodospirillum*, sin embargo no apareció *Rhodopseumonas*. *Rhodopseudomonas* fue el género más recuperado a través de la utilización de medios de cultivo.

Streptomyces, una actinobacteria cuyo filotipo fue abundante en los análisis de pirosecuenciación, fue el género más recuperado a través de medios de cultivo, demostrando que hay una correlación entre la diversidad cultivable y no cultivable.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

1. Se obtuvo 15 aislamientos de bacterias ácido lácticas, de los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja, 63% de las cuales pertenecen al género de *Lactobacillus plantarum*.
2. Se logró tener 28 aislamientos de bacterias fotosintéticas no sulfurosas, de los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja. Todas ellas corresponden al género de las *Rhodospseudomonas palustris*.
3. Se obtuvieron 33 aislamientos de actinomicetos, de los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja. Todos pertenecientes al género *Streptomyces*.
4. El 50% de los actinomicetos son productores de ácido indolil acético, siendo el aislamiento 2DA con 13µg/ml el máximo productor.
5. Del total de bacterias ácido lácticas, 3 poseen actividad antagonista contra *Erwinia caratovora*, a las 24 y 48 horas, con halos de 4mm.
6. Se evidenció la capacidad de los actinomicetos de inhibir el crecimiento *in vitro* de patógenos como *Salmonella enteritidis*, *S. tiphymurium*, *E.coli*, *Ralstonia sp.* sin embargo, el 75% de los actinomicetos son capaces de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*.
7. La degradación de celulosa, se evidenció en el 73% de los aislamientos, siendo el aislamiento 9DA el que presentó el mayor halo de degradación (28 mm).
8. En cuanto a la degradación de xilano, el mayor halo de degradación lo presentó el aislamiento 47CA, con 19 mm. Al igual que en la anterior prueba el 73% fue capaz de degradar este carbohidrato.
9. La hidrólisis de quitina se evidenció en 76% de los actinomicetos, sugiriendo que una de las formas de antagonismo contra los hongos fitopatógenos puede ser la producción de quitinasas.
10. La solubilización de fosfatos es una actividad llevada a cabo por parte del total de BAL, donde la mayor solubilización fue de 1478 ppm realizada por el aislamiento 6DB.

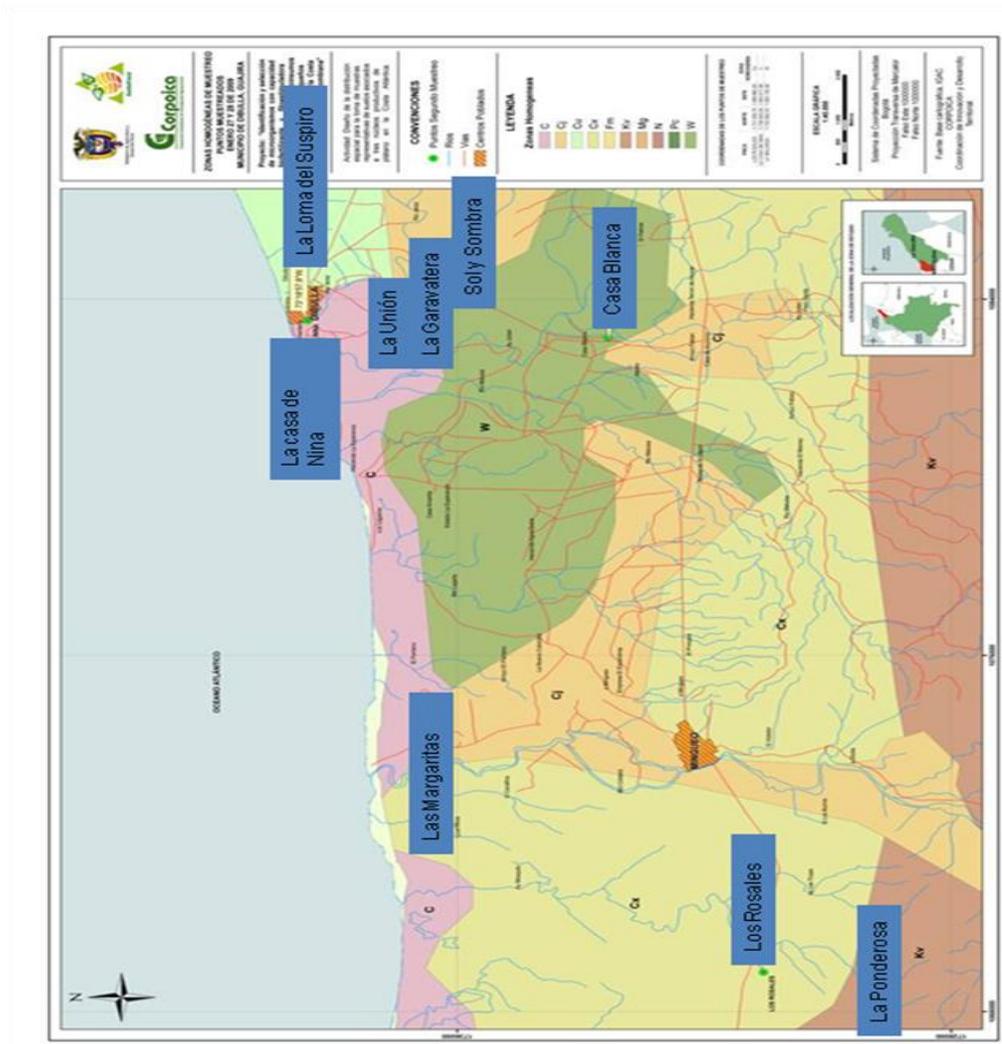
11. El 30% de los actinomicetos solubilizaron fosfato de calcio con producción de máxima de 95 ppm liberado al medio suplementado con roca fosfórica.
12. El 78% de las BFNS aisladas son fijadoras de nitrógeno, al utilizar el nitrógeno atmosférico como única fuente de nitrógeno para su crecimiento.
13. De los actinomicetos el 45% tiene la capacidad para fijar nitrógeno de la misma forma que las BFNS.
14. Los suelos de Dibulla, Curumaní y María la Baja presentaron microorganismos nativos con capacidad promotora de crecimiento vegetal y antagonista de patógenos de importancia agrícola y humana, diversidad que pudo ser dilucidada mediante estudios de metagenómica.
15. Con los resultados obtenidos en las conclusiones anteriores, los microorganismos aislados sugieren la promoción de crecimiento vegetal, por lo que podrían ser considerados como bacterias promotoras de crecimiento de plantas.

5.2 Recomendaciones

1. Puesto que algunas de las cepas estudiadas *in vitro*, son capaces de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno, se hace necesario cuantificar el aporte de estos nutrientes en plantas inoculadas con estos microorganismos, tanto en invernadero como durante el establecimiento en campo.
2. Los aislamientos que presentan actividad antagónica contra fitopatógenos, se deberían probar en invernadero y en campo para evaluar el comportamiento como controladores biológicos *in vivo*.
3. Se recomienda evaluar una coinoculación o mezcla microbiana *in vitro* de los tres grupos funcionales, probando que conservan sus características iniciales.
4. Evaluar mediante huella genómica la presencia de los tres grupos funcionales luego de la inoculación en vivero y en campo para observar su comportamiento en cuanto al cambio de poblaciones a través del tiempo, con el fin de observar si hay establecimiento de los microorganismos.
5. Ya que algunos de estos microorganismos, debido a sus propiedades como solubilizadores de fosfato, fijación de nitrógeno, productores de indol y ser antagonistas entre otros, son considerados como bacterias promotoras de crecimiento vegetal se podría probar su efecto sobre la aplicación directa en la semilla y en campo. Accidentalmente observar si *in vivo* estos mecanismos implicados en la promoción del crecimiento de plantas se expresan de igual forma que *in vitro*.
6. Identificar cuales son los metabolitos secundarios que producen los actinomicetos para poder hacer uso de ellos más adelante.
7. Determinar cual es la dosis de microorganismos adecuada para ser aplicada en campo.

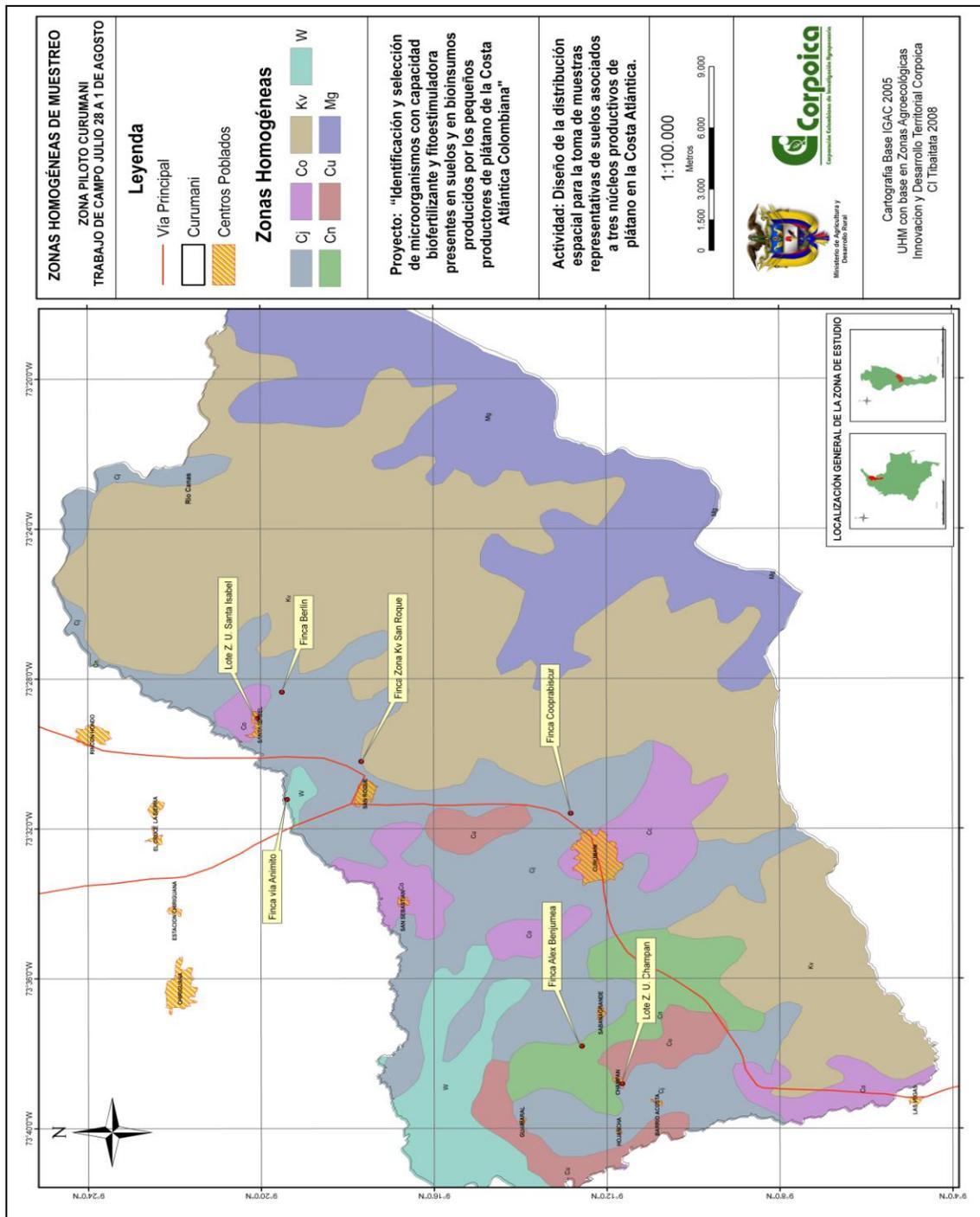
A. Anexo A: Mapa de zonas homogéneas de Dibulla – Curumaní – María la Baja.

Dibulla

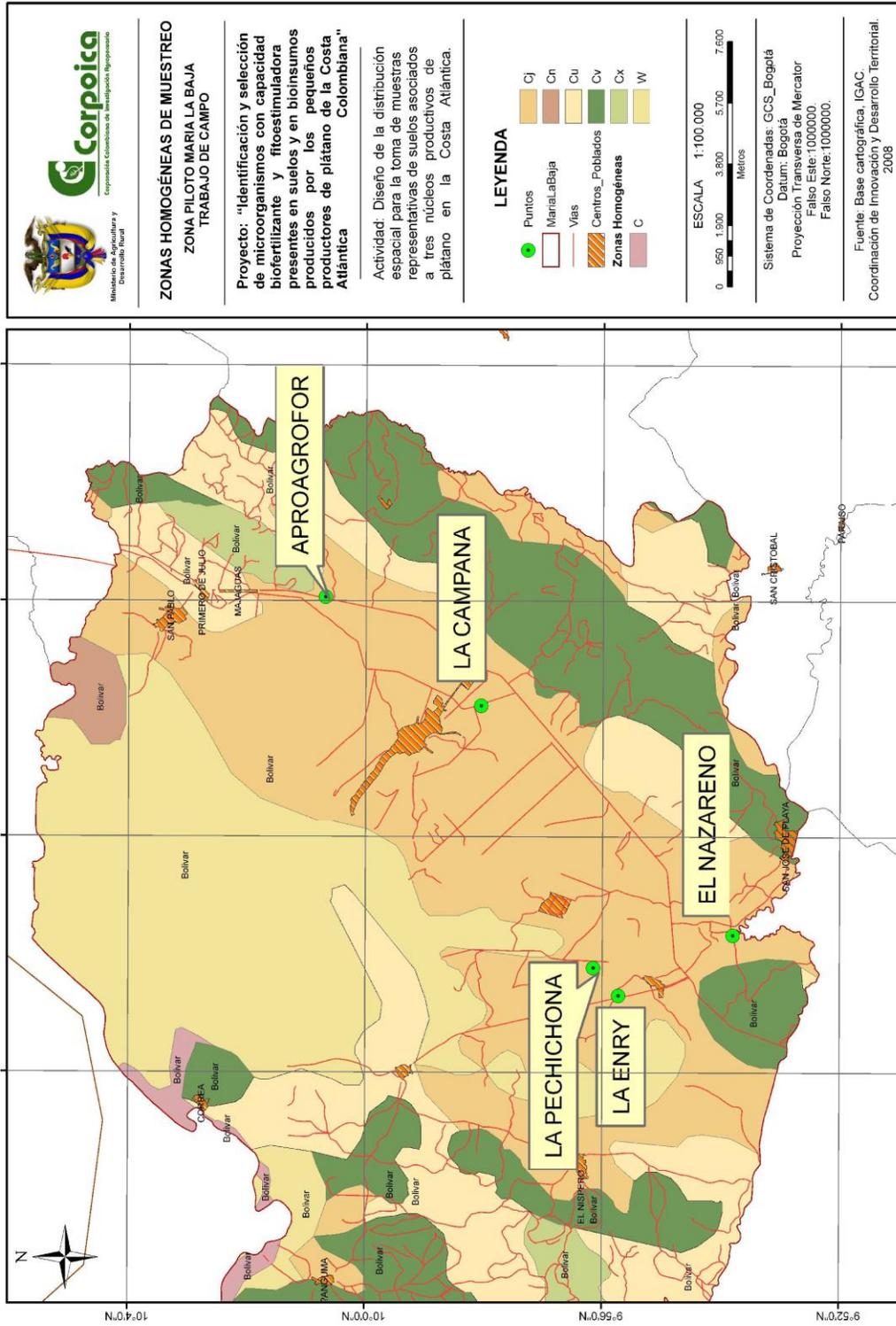


Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

Curumani



María la Baja



B. Anexo B: Análisis físico – químico de suelos de Dibulla – Curumaní – María la Baja.

Ident. Muestra	No. Reg.	Prof. (cm)	Textura	pH	M.O. %	P	S	Al+H cmol/kg	Sat. Al %
						mg / kg			
1	1531	30	FL	6,8	2,5	52,7	2,5	0,00	0
2	1532	30	FA	5,5	0,9	6,9	10,2	0,15	0
3	1533	30	FL	6,2	2,6	19,5	3,6	0,00	0
4	1534	30	FL	6,4	2,2	77,0	1,4	0,00	0
5	1535	30	F	6,4	1,2	55,0	1,4	0,00	0
6	1536	30	FA	5,7	3,1	25,7	0,7	0,18	0
M1	2295	NO INDICA	F-A	6,4	2,1	5,1	2,4	0,00	0
M2	2296	NO INDICA	F-A	5,7	2,0	4,4	1,0	0,18	0
M3	2297	NO INDICA	F	6,8	1,3	19,1	1,3	0,00	0
M4	2298	NO INDICA	F-A	6,6	0,7	127,5	4,4	0,00	0
M5	2299	NO INDICA	F-A	6,8	2,8	27,0	1,5	0,00	0
M6	2300	NO INDICA	F-A	6,0	2,1	6,8	0,9	0,00	0
M7	2301	NO INDICA	F-A	6,5	2,4	6,5	0,8	0,00	0
LA CAMPANA	3905	NO INDICA	FAr	5,7	2,7	13,5	5,2	0,21	0
ENORI	3906	NO INDICA	FAr	6,5	5,5	179,4	6,2	0,00	0
LA PECHICHONA	3907	NO INDICA	FAr	7,0	7,5	333,8	2,9	0,00	0
EL NAZARENO	3908	NO INDICA	FAr	6,1	3,9	63,8	1,6	0,00	0
7	4206	30	F Ar	6,5		40,4	9,9	0	0
8	4207	30	A	7,3	1,4	79,1	7,2	0	0
9	4208	30	F A	5,7	1,1	2,0	8,3	0,21	0

Ident. Muestra	No. Reg.	Cationes de Cambio						Elementos Menores					
		Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	C.E. dS/m	Fe	Cu	Mn	Zn	B
		cmol _c / kg						mg / kg					
1	1531	0,00	8,64	1,90	0,17	0,08	10,79	0,21	65	3,8	8,3	1,3	0,28
2	1532	0,00	2,93	0,93	0,11	0,37	4,49	0,73	117	0,2	3,0	0,7	0,22
3	1533	0,00	8,55	2,26	0,18	0,10	11,09	0,28	182	4,2	10,4	3,6	0,26
4	1534	0,00	7,36	1,85	0,22	0,09	9,53	0,19	95	3,2	8,1	2,7	0,19
5	1535	0,00	4,90	1,10	0,13	0,08	6,21	0,13	96	2,0	2,9	0,6	0,09
6	1536	0,00	2,75	0,35	0,07	0,05	3,39	0,08	30	0,4	1,9	0,3	0,13
M1	2295	0,00	4,93	1,39	0,10	0,07	6,48	0,22	151	1,4	2,4	1,9	0,12
M2	2296	0,00	2,12	0,70	0,10	0,04	3,13	0,13	100	0,8	3,6	1,2	0,12
M3	2297	0,00	6,24	0,85	0,08	0,07	7,25	0,13	50	1,5	1,3	1,3	0,22
M4	2298	0,00	1,67	0,30	0,11	0,03	2,11	0,10	48	0,5	0,5	0,9	0,16
M5	2299	0,00	5,74	2,16	0,12	0,03	8,05	0,26	152	1,8	3,1	1,2	0,22
M6	2300	0,00	4,49	0,84	0,11	0,05	5,50	0,11	126	2,3	2,5	1,3	0,12
M7	2301	0,00	3,90	0,62	0,10	0,02	4,64	0,15	40	1,1	3,4	2,5	0,14
LA CAMPANA	3905	0,00	11,26	3,96	0,37	0,08	15,87	0,27	134	7,0	8,6	1,2	0,42
ENORI	3906	0,00	15,79	6,78	0,95	0,10	23,63	0,45	37	4,3	6,8	4,0	0,48
LA PECHICHONA	3907	0,00	18,88	6,67	1,72	0,08	27,35	0,68	57	5,1	4,9	5,6	0,28
EL NAZARENO	3908	0,00	15,03	6,56	1,02	0,08	22,69	0,27	85	5,9	7,0	2,0	0,34
7	4206	0	10,43	3,17	0,21	0,14	13,95	0,19	146	3,2	7,3	2,8	0,09
8	4207	0	4,34	0,57	0,20	0,08	5,19	0,14	24	1,7	10,3	3,1	0,11
9	4208	0	1,25	0,31	0,09	0,05	1,91	0,09	30	2,9	22,6	0,6	0,09

C. Anexo C: Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas – Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas – Actinomicetos

Báctérias Ácido Lácticas

Municipio	Nombre de la Finca	Zona	Aislamiento
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	1DB
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	3DB
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	5DB
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	6DB
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	7DB
Dibulla	La Loma del suspiro	Cu	9DB
Dibulla	Las Margaritas	C	18DB
Dibulla	La Ponderosa	Cx	19DB
Dibulla	La Ponderosa	Cx	24DB
Curumaní	Zona San Roque	Kv	39CB
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	40CB
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	41CB
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	44CB
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	47CB
María la Baja	La Endry	Cj	61BB

Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas

Municipio	Nombre de la Finca	Zona	Aislamiento
Dibulla	La Garavatera	Cj	1DF
Dibulla	La Garavatera	Cj	2DF
Dibulla	Las Margaritas	C	4DF

Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

Dibulla	Las Margaritas	C	7DF
Dibulla	La Ponderosa	Cx	9DF
Curumaní	Finca Alex Benjumea	CN	13CF
Curumaní	Finca Alex Benjumea	CN	14CF
Curumaní	Finca Alex Benjumea	CN	16CF
Curumaní	Berlin	Cj	17CF
Curumaní	Berlin	Cj	18CF
Curumaní	Berlin	Cj	20CF
Curumaní	Berlin	Cj	21CF
Curumaní	Berlin	Cj	22CF
Curumaní	Berlin	Cj	23CF
Curumaní	Lote Z.U Santa Isabel	Co	30CF
Curumaní	Lote Z.U Santa Isabel	Co	31CF
Curumaní	Zona San Roque	Kv	33CF
Curumaní	Zona San Roque	Kv	35CF
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	36CF
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	37CF
Curumaní	Campan	Cu	40CF
María la Baja	La Campana	Cj	44BF
María la Baja	La Endry	Cj	46BF
María la Baja	La Endry	Cj	47BF
María la Baja	La Endry	Cj	48BF
María la Baja	La Pechichona	Cj	50BF
Dibulla	La Malanga	W	56BF
Dibulla	Los Rosales	Cx	59BF

Actinomicetos

Municipio	Nombre de la Finca	Zona	Aislamiento
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	2DA
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	3DA
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	4DA
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	5DA
Dibulla	Sol y Sombra	Cj	7DA
Dibulla	La Loma del Suspiro	Cu	9DA

Dibulla	La Garavatera	Cj	20DA
Dibulla	Las Margaritas	C	28DA
Dibulla	La Ponderosa	Cx	30DA
Curumaní	Finca Alex Benjumea	Cn	36CA
Curumaní	Berlin	Cj	40CA
Curumaní	Berlin	Cj	41CA
Curumaní	Berlin	Cj	42CA
Curumaní	Berlin	Cj	43CA
Curumaní	Berlin	Cj	45CA
Curumaní	Finca Via Animito	W	46CA
Curumaní	Finca Via Animito	W	47CA
Curumaní	Lote Z.U Santa Isabel	Co	48CA
Curumaní	Lote Z.U Santa Isabel	Co	49CA
Curumaní	Lote Z.U Santa Isabel	Co	50CA
Curumaní	Zona San Roque	Kv	51CA
Curumaní	Zona San Roque	Kv	52CA
Curumaní	Zona San Roque	Kv	54CA
Curumaní	Zona San Roque	Kv	55CA
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	57CA
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	64CA
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	70CA
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	71CA DA
Curumaní	Cooprabiscur	Cj	71CA - BA
María la Baja	La Campana	Cj	72BA
María la Baja	La Campana	Cj	76BA
María la Baja	La Pechichona	Cj	78BA
Dibulla	La Malanga	W	89DA

D. Anexo D: Características macroscópicas de aislamientos de actinomicetos

Aislamiento	Masa aerea	Pigmentos melanoides	Pigmento del lado reverso	Pigmentos solubles
2DA	Gris	Café	café	Café
3DA	Gris blanco	Café	Café	Café
4DA	verde (M)/Blanco (J)	café oscuro	X	Café III
5DA	Blanca	café claro	X	Café II
7DA	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
9DA	verde (M)/Blanco (J)	marrón	Marrón	Café IIII
20DA	Blanco Gris	Blanco	X	X
28DA	Gris blanco	Café	Café	Café
30DA	Blanco	Blanco	X	X
36CA	Verde	Verde Oscuro	Verde	Café I
40CA	Gris blanco	Café	Café	Café
41CA	Gris blanco/ café claro	amarillo	amarillo	amarillo
42CA	Blanca	Café claro	Vinotinto fucsia	X
43CA	Gris blanco	crema	crema	crema
45CA	Gris blanco	crema	crema	café
46CA	Blanco gris	blanco	crema	crema
47CA	Gris claro	Blanco	x	x
48CA	Gris claro beige	Blanco	X	X
49CA	Blanco algodón	Café claro	Café claro	Café I
50CA	Blanca	Amarillo quemado	Marrón claro	Café II
51CA	Rosado salmón	Blanco	Blanco piel	X
52CA	Naranja claro	Naranja claro	X	X
54CA	Rojo naranja	Blanca piel	Amarillo quemado	Café II
55CA	Gris	Blanca	X	X
57CA	Gris	crema	café	café
64CA	Blanco	Blanco	X	X

Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

70CA	Gris	Blanco gris	X	X
71CA DA	Blanca	Blanca	X	X
71CA - BA	Verde Blanco	Café	Marrón	Café III
72BA	Verde	Verde	X	X
76BA	Gris	crema	café	café
78BA	Rojo salmón	Rosado	Blanco piel	Café I
89DA	Blanca	Amarillo	X	X

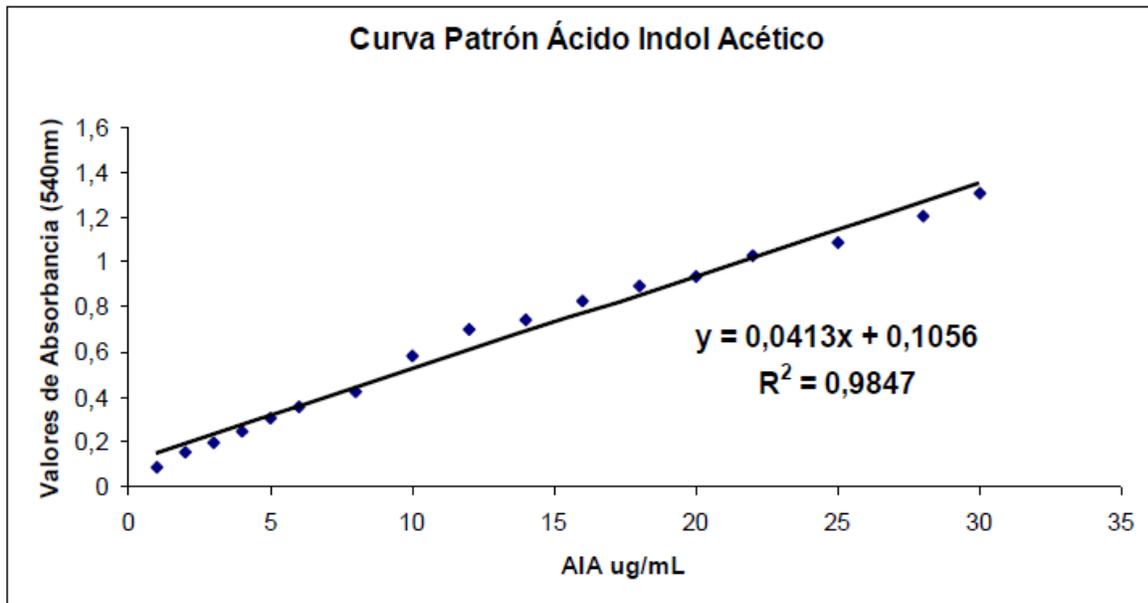
E. Anexo E: Indoles Totales

Medio de cultivo BT

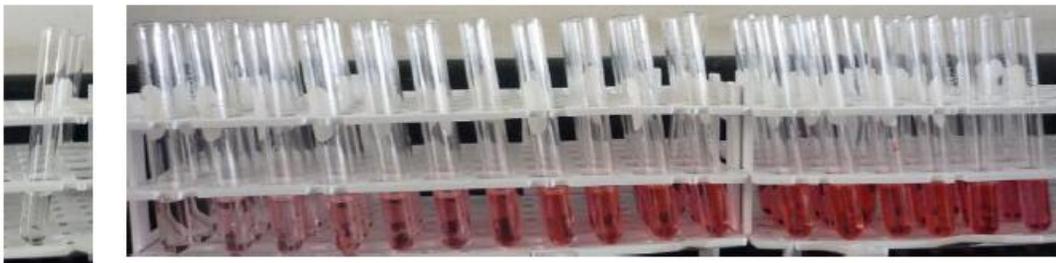
Componentes	g/L
Glucosa	5
Fosfato monoácido de potasio	1
Nitrato de amonio	0.4
Cloruro de sodio	0.2
Sulfato de magnesio*7H ₂ O	0.4
Triptona	20
Triptófano	0.1

Curva Patrón Ácido Indol Acético:

Concentración de ácido indolil acético en µg/ml	Absorbancia (540 nm)
1	0,082
2	0,151
3	0,198
4	0,246
5	0,299
6	0,356
8	0,422
10	0,577
12	0,699
14	0,745
16	0,821
18	0,892
20	0,938
22	1,030
25	1,086
28	1,201
30	1,304



Blanco



1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, y 30 ug/ml AIA (Triplicado)

F. Anexo F: Agar Carboximetilcelulosa – Xilano – Quitina.

Carboximetilcelulosa

Componentes	g/L
CMC	10
Extracto de levadura	2.5
Peptona Universal	2.5
Sulfato de amonio	0.5
Cloruro de calcio	0.5
Fosfato monobásico de potasio	0.1
Fosfato dibásico de potasio	0.1

Ajustar pH 7.0 – 7.2

Reveladores: Rojo congo al 1% - NaCl 0.1M

Xilano

Componentes	g/L
Xilano en hojuelas	10
Fosfato diácido de potasio	1
Nitrato de sodio	2
Sulfato de magnesio	0.5
Elementos traza	10 ml

Ajustar a pH 7.0

Quitina

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄ y KH ₂ PO ₄	30 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	15
CaCl ₂	5
FeCl ₃	0.6
NaCl	5

Se suplementa con quitina coloidal al 1%.

Preparación quitina coloidal

Tomar 10 g de quitina y disolver en 100ml de H₃PO₄ concentrado (85%), dejar en agitación a 4°C durante 48h. Posteriormente filtrar el líquido resultante. empleando fibra de vidrio y adicionar etanol acuoso al 50%, poner la mezcla en agitación hasta que se observe homogénea. Realizar lavados con agua destilada por 48h y diluir la suspensión hasta 10 mg/ml-1 para prevenir la contaminación, por último adicionar cristal de tymol y almacenar a 4°C.

G. Anexo G: Agar Pikovskaya – SMRS – Composición de Roca Fosfórica – Curva de calibración de fosfatos- Resultados ANOVA

Agar Pikovskaya

Componentes	g/L
Glucosa	10
Sulfato de amonio	0.5
Sulfato de magnesio	0.1
Extracto de levadura	0.5
Cloruro de potasio	0.2
Cloruro de sodio	0.2
Sulfato de hierro	0,002
Fosfato tricálcico	5

Ajustar pH a 7.0

Agar SRS: (Sundara, Rao y Shina 1963) con fosfato tricálcico ó roca fosfórica

Componentes	g/L
Sulfato de amonio	0.5
Cloruro de potasio	0.2
Sulfato de magnesio	0.3
Sulfato de manganeso	0.004
Sulfato de hierro * 7H ₂ O	0.002
Cloruro de sodio	0.2
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.5
Púrpura de bromocresol	0.1
Fosfato tricálcico*	5

Ajustar pH a 7.2

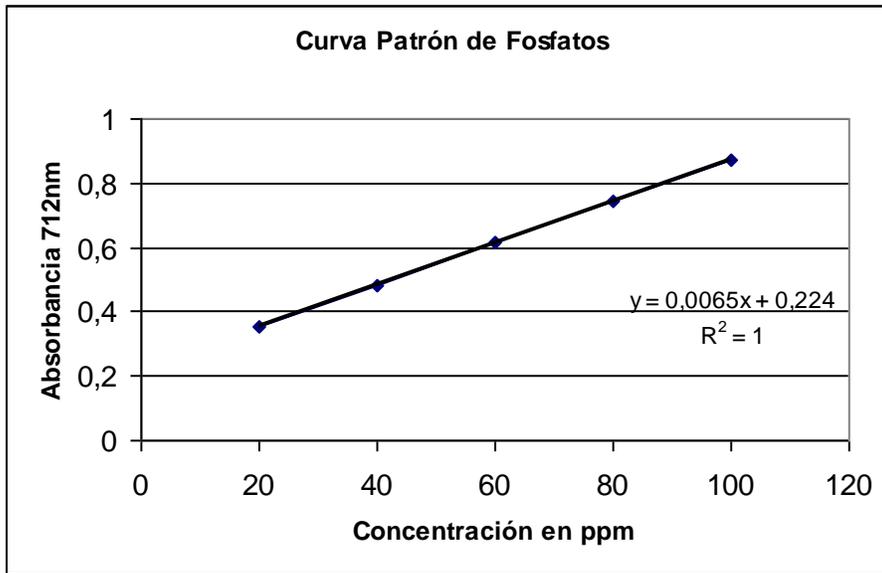
*El fosfato tricálcico o la roca fosfórica se esteriliza en seco por separado, una vez estéril se adicional al medio estéril y se homogeniza.

Composición Química de Roca Fosfórica

COMPOSICIÓN QUÍMICA PROMEDIO DE FOSFORITA PESCA (30%)	
Fósforo Total (%P ₂ O ₅)	30%
Fósforo Asimilable (%P ₂ O ₅)	4%
Fósforo de Lenta Asimilación (%P ₂ O ₅)	26%
Calcio	40%
Silicio	12%
Magnesio	0.1%
Manganeso	40 ppm
Cobre	30 ppm
Molibdeno	10 ppm
Zinc	300 ppm
Humedad	3%

Curva de calibración de fosfatos para la técnica Spectroquant MERCK® (PMB)

Concentración de P disponible en ppm	Absorbancia 712nm
20	0.354
40	0.484
60	0.614
80	0.744
100	0.874



H. Anexo H: Agar Ashby – Agar jNfb – Curva patrón acetileno -

Agar Ashby

Componentes	g/L
Manitol	5
Sulfato de magnesio	0.2
NaCl	0.2
Sulfato de calcio	0.1
Carbonato de calcio	0.1
Fosfato diácido de potasio	0.2

Ajustar pH a 7.2

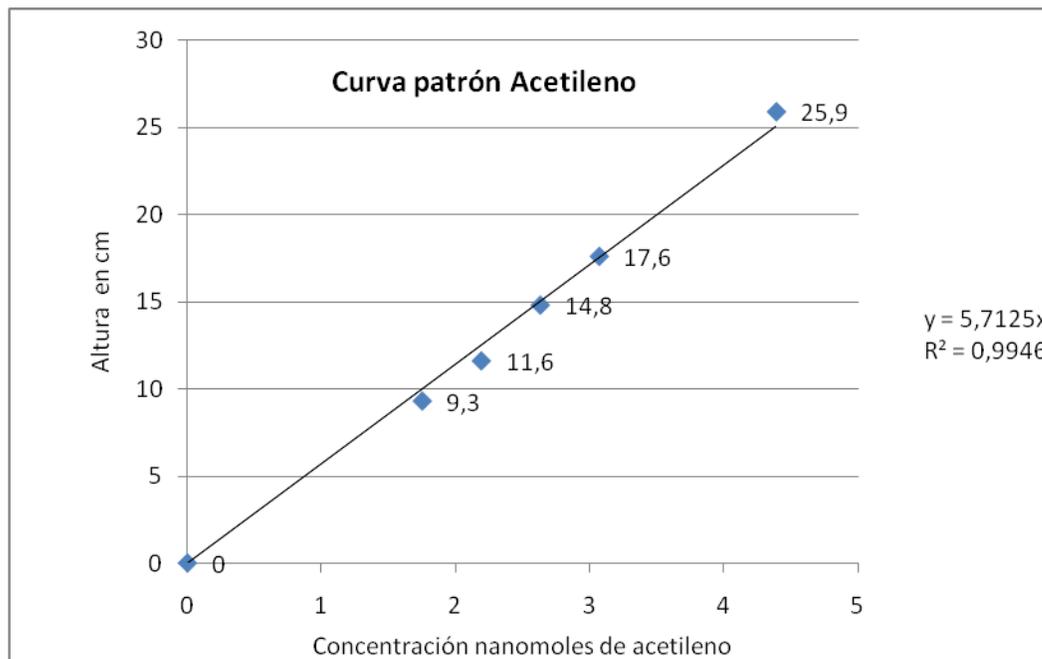
Agar jNfb

Componentes	g/L
Ácido málico	5
Fosfato ácido de potasio	0,5
Sulfato de Magnesio	0,2
Cloruro de sodio	0,1
Cloruro de calcio	0,02
Hidroxido de potasio	4,5
Azul de bromotimol	0,5% en etanol
FeEDTA (Solución 1,64%)	4ml
Solución de vitaminas	1 ml
Solución de micronutrientes	2 ml

Completar a 1000 ml y ajustar pH a 6,5 – 6,8; si se prepara un medio semisólido agregar 1,75 – 1,8 g de agar.

Curva Patrón Acetileno

Concentración en nmol de acetileno	Altura en cm
0	0
1,75	9,3
2,19	11,6
2,63	14,8
3,07	17,6
4,39	25,9



I. Anexol: Halos de acidificación y PSE para actinomicetos

Actual Cod.	Carbonato de calcio 3 días	Roca fosfórica 3 días				Carbonato de calcio 5 días	Roca fosfórica 5 días			
	tamaño halo acidificación	tamaño halo sol	tamaño halo	PSE	tamaño halo acidificación	tamaño halo acidificación	tamaño halo sol	tamaño real halo	PSE	tamaño halo acidificación
2DA	NO				14	NO				NO
3DA	NO				15	NO				15
4DA	NO				NO	NO				NO
5DA	NO				NO	NO				NO
7DA	14				15	NO				15
9DA	NO				NO	11				NO
20DA	12				23	NO				23
28DA	NO				NO	12				NO
30DA	NO				16	NO				16
36CA	NO				NO	NO				NO
40CA	NO				NO	NO				NO
41CA	20				35	15				40
42CA	NO				NO	NO				NO
43CA	22				NO	NO				NO
45CA	NO				13	22				13
46CA	13				25	20				40
47CA	14				35	25				40
48CA	12				25	17				40
49CA	NO				20	17				25
50CA	20				13	13				21
51CA	15				18	20				24
52CA	NO				19	NO				17
54CA	NO				12	12				NO
55CA	12				NO	18				17
57CA	7				15	17				40
64CA	15				35	NO				40
70CA	13				40	18				40

Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

71CA DA	18				40	20				40
71CA - A - BA	NO				NO	NO				NO
72BA	NO				25	NO				40
76BA	NO				13	NO				13
78BA	13	13	2	18,2	55	15	17	5	58	45
89DA	NO				30	15				40

Los cuadros en blanco indican que no se presentó halo.

J. Anexo J: Salidas de SAS para Solubilización de fosfato por parte de BAL y actinomicetos. Salida de SAS para fijación de nitrógeno por parte de BAL y actinomicetos.

Solubilización de fosfato por parte de los actinomicetos

		Class Level Information								
Class	Levels	Values								
muestra	9	Control	M1	M11	M12	M13	M14	M15	M17	M6
municipio	4	Control	Curumani	Dibulla	MarialaB					
aislamiento	11	30DA	3DA	43CA	47CA	49CA	50CA	54CA	57CA	76BA 7DA E.a
		Number of Observations Read		33						
		Number of Observations Used		33						
		The SAS System		00:31		Thursday, February 5, 2009 3				
		The GLM Procedure								
Dependent Variable: ppm										
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F					
Model	10	50462.90120	5046.29012	6.94	<.0001					
Error	22	15997.01335	727.13697							
Corrected Total	32	66459.91455								
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	ppm Mean						
	0.759298	70.51183	26.96548	38.24248						
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F					
municipio	3	37600.08001	12533.36000	17.24	<.0001					
muestra(municipio)	5	6475.88505	1295.17701	1.78	0.1584					
aisla(muestr*munici)	2	6386.93613	3193.46807	4.39	0.0248					
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F					
municipio	3	35913.76264	11971.25421	16.46	<.0001					
muestra(municipio)	5	6475.88505	1295.17701	1.78	0.1584					
aisla(muestr*munici)	2	6386.93613	3193.46807	4.39	0.0248					

Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

Solubilización de fosfato por parte de las Bacteria ácido lácticas

Class	Levels	Values
muestra	9	Control M1 M11 M12 M13 M14 M15 M17 M6
municipio	4	Control Curumani Dibulla MariaLaB
aislamiento	11	30DA 3DA 43CA 47CA 49CA 50CA 54CA 57CA 76BA 7DA E.a

Number of Observations Read	33
Number of Observations Used	33
The SAS System	
00:31 Thursday, February 5, 2009 3	
The GLM Procedure	

Dependent Variable: ppm

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	50462.90120	5046.29012	6.94	<.0001
Error	22	15997.01335	727.13697		
Corrected Total	32	66459.91455			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	ppm Mean
	0.759298	70.51183	26.96548	38.24248

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
municipio	3	37600.08001	12533.36000	17.24	<.0001
muestra(municipio)	5	6475.88505	1295.17701	1.78	0.1584
aisla(muestr*munici)	2	6386.93613	3193.46807	4.39	0.0248

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
municipio	3	35913.76264	11971.25421	16.46	<.0001
muestra(municipio)	5	6475.88505	1295.17701	1.78	0.1584
aisla(muestr*munici)	2	6386.93613	3193.46807	4.39	0.0248

Fijación de nitrógeno por parte de los actinomicetos

```

#
                                The SAS System      23:37 Wednesday, February 4, 2009
                                The GLM Procedure

                                Class Level Information

Class          Levels  Values
muestra        13  Control M1 M10 M11 M12 M13 M14 M17 M2 M4 M6 M7 M8
municipio      4  Control Curumani Dibulla MarialaB
aislamiento    16  20DA 30DA 36CA 42CA 43CA 47CA 4DA 50CA 54CA 5DA 71DA 72BA 76BA 89DA 9DA BisB5

                                Number of Observations Read      51
                                Number of Observations Used       51
#

```

```

#
                                The SAS System      23:37 Wednesday, February 4, 2009
                                The GLM Procedure

```

Dependent Variable: nmo1m1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	5036.962992	335.797533	3.08	0.0031
Error	35	3819.926639	109.140761		
Corrected Total	50	8856.889631			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	nmo1m1 Mean
0.568706	7.478384	10.44705	139.6966

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
municipio	3	1416.590355	472.196785	4.33	0.0107
muestra(municipio)	9	3068.076090	340.897343	3.12	0.0073
aisla(muestr*munici)	3	552.296548	184.098849	1.69	0.1876

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
municipio	3	1323.481868	441.160623	4.04	0.0144
muestra(municipio)	9	3126.403492	347.378166	3.18	0.0065
aisla(muestr*munici)	3	552.296548	184.098849	1.69	0.1876

```

#
                                The SAS System      23:37 Wednesday, February 4, 2009

```

Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana

Fijación de nitrógeno por parte de las BFNS

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
muestra	13	Control M10 M11 M13 M14 M15 M16 M17 M18 M4 M5 M6 M8
municipio	4	Control Curumani Dibulla MariaLab
aislamiento	23	13CF 14CF 16CF 17CF 18CF 1DF 22CF 23CF 2DF 30CF 31CF 33CF 35CF 36CF 36CF2 40CF 44BF 47BF 48BF 4DF 59DF 9DF 81S85

Number of Observations Read 69
Number of Observations Used 69

‡

The SAS System 00:10 Thursday, February 5, 2009 4

The GLM Procedure

Dependent Variable: nmo1m1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	22	4570.218017	207.737183	6.02	<.0001
Error	46	1586.913675	34.498123		
Corrected Total	68	6157.131692			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	nmo1m1 Mean
0.742264	4.082034	5.873510	143.8869

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
municipio	3	887.214957	295.738319	8.57	0.0001
muestra(municipio)	9	1813.780487	201.531165	5.84	<.0001
aisla(muestr*munici)	10	1869.222574	186.922257	5.42	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
municipio	3	978.877151	326.292384	9.46	<.0001
muestra(municipio)	9	1813.780487	201.531165	5.84	<.0001
aisla(muestr*munici)	10	1869.222574	186.922257	5.42	<.0001

Bibliografía

- Abdelbasset, M., and Djamila, K. (2008). Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolates from Algerian fermented milk "Raïb". *Afr. J. Biotechnol.* 7(16):2908-2914.
- Achenbach, L., Carey, J., and Madigan, M. (2001). Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(7):2922-2926.
- Acuña, A., Pucci, G., Pucci, O. (2010). Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aislados de un suelo de la Patagonia. *Ecosistemas.* 19(2): 125-136.
- Agüero, A. Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*); en medio líquido a base de melaza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) azucarera, el viejo, guanacaste, Costa Rica. Tesis Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica 2009.
- Aguilar, A., Dubois-Dauphin, R., Ghalfi, H., Campos, D., and Thonart, P. (2009). Description of two Enterococcus strains isolated from traditional Peruvian artisanal produced cheeses with a bacteriocin-like inhibitory activity. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environmental.* 13(3):349-356.
- Ahmadian, A., Ehn, M., and Hober, S. (2006). Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta.* 363:83-94.
- Alaniz, R., Martín del Campo, C., Juan, A., and Rosas, B., (2006). Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas con Acción Antagónica en Contra de Patógenos Bacterianos de Importancia en Salud Pública. *XVII semana de la investigación científica en el CUCBA. Vía on line:* http://www.cucba.udg.mx/new/publicaciones/avances/avances_2006/Contenido.pdf. 703-705.

- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Anukol, U., Gaze, W., and Wellington E. (2004). *In situ* monitoring of streptothricin production by *Streptomyces rochei* F20 in soil and rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(9):5222-5228.
- Aslantas, R., Cakmakci, R., and Sahin F., (2007). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia Horticulturae*. 11(4):371-377.
- Ayyadurai, N., Naik, P., Rao, M., Kumar, R., Samrat, S., Manohar, M., and Sakthivel, N. (2006). Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology*. 100:926-937.
- Bergey's Manual of determinative bacteriology. 2000. J.G. Holt, N. R. Krieg, P.H.A. Sneath y J.T. Stanley (ed). Zippincott Williams & Wilkings, USA.
- Bhattacharjee, R., Singh, A., and Mukhopadhyay, S. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology Biotechnology*. 80:199-209.
- Biebl, H. and Pfenning, N. (1982). Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In *The Prokaryotes* ed. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. Berlin: Springer. pp. 267-273.
- Bloemberg, G., and Lugtenberg, B. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol*.4:343-350.
- Bobadilla, C., and Rincón, S. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis de pregrado en Microbiología industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2008.
- Bolaños, M., Aranzazu, F., Celis, L., Morales, H., and Zuluaga, L., (2002). Fertilización e Incidencia de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis morelet*) en plátano dominico-hartón (*MUSA AAB*) en Armenia, Colombia. Acorbat. Memorias XV Reunión. Asociación de Bananeros de Colombia. Cartagena de Indias, Colombia.

- Buée, M., De Boer, W., Martin, F., Overbeek, L., and Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil*. 312:189-212.
- Bürgmann, H., Widmer, F., Von, W., and Zeyer, J. (2004). New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(1):240-247.
- Bryant, D., and Frigaard, N. (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*. 14(11): 488-496.
- Caballero- Mellado, J., (2006) Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2):154-155.
- Caballero- Mellado, J., Tenorio, S., Onofre, J., Castro, R., Estrada, P., Paredes, G. et. al. (2006) Mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas expresados por nuevas especies de *Burkholderia* fijadoras de nitrógeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2):155-156.
- Caballero, T., and Camelo, R. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de suelos algodoneros, departamentos de Cesar y Meta. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2006.
- Cabrera, E., Gutierrez, B. and Poo, N. (2009). Calidad e inocuidad, palabras claves en la agricultura ecológica. *Agricultura Orgánica*. 1:31-33.
- Cadirci, B., and Citak, S., (2005). A comparación of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4(4):237-241.
- Cantera, J., Kawaski, H., and Seki, T., (2004).The nitrogen-fixing gene (nifH) of *Rhodopseudomonas palustris*: a case of lateral gene transfer?. *Microbiology*. 150(7):2237-2246.
- Cardona, G., Peña-Venegas, C., and Ruiz-García, M. (2009) Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipo de vegetación de la Amazonía colombiana: abundancia, morfotipos y el gen q6s DNAr. *Revista de Biología Tropical/Internacional Journal of Tropical Biology and Conservation*. 75(4):1119-1139.

- Carcaño-Montiel, M., Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., Molina-Galán, J., and Bashan, Y. (2006). Actividad nitrógenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocinte. *TERRA Latinoamericana*. 24(4):493-502
- Castillo- Fabela, E., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, D., Cepeda-Siller, M., and Zamora-Villa, V. (2001). Efectividad de Actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19(2): 203-207.
- Castellanos, D., Cubillos, R., and Argüello, H. (2009). Selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético) a partir de muestras de suelo rizosférico, como primera etapa en el desarrollo de un biofertilizante. *Revista Brasileira de Agroecología*. 4(2): 1720-1723.
- Causse, M., Franco-Álvarez de Luna, F., García-Mayorgas, A., Rodríguez, F. and Casal, M. (2006). Sensibilidad a los antimicrobianos de *Enterococcus faecalis* aislados de pacientes en la provincia de Córdoba (España). *Revista Española de Quimioterapia*. 19(2):140-143.
- Celis, L. and Gallardo, I. *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos*. Tesis pregrado en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2008.
- Chao, A and Bunge, J. (2002). Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics*. 58:531-539
- Chen, G., Zhu, H., and Zhang, Y. (2003). Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in Microbiology*. 154:393-398
- Chen, W., and Kuo, T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of Gram negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. 21(9):2260-
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H. And Sa, T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilising bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*. 37:1970-1974
- Cheol, Y. Hah, Y., and Hong, S. (1984). Quantitative analysis of tubercidin in *Streptomyces tubercidicus* cultures by high pressure liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 7(1):151-158.

- Cook, A., and Meyers, P. (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1907-1915.
- Coolborn, A. (2005). Antibacterial quantification from lactic acid bacteria isolated from food sources and soil. *Journal of Food Technology*. 3(4):568-571.
- Cotes, L., 2010. Avances en Investigación participativa en Plátano y en Agricultura Orgánica. Via on line: http://www.ceaecuador.org/imagesFTP/4769.platano_y_agricultura_organica.pdf. Consultado el 30 de mayo de 2010.
- Cuello, J., Díaz, O., and Torregroza, G. *Importancia de la semilla en la Producción de Plátano*. CORPOICA CENTRO DE investigación de Turipaná. *Vía on line*: http://www.turipana.org.co/produccion_platano.html. Consulta realizada el 12 de enero de 2009.
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews*. 3: 470-478.
- Díaz, M., Rodríguez, C., and Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 48(2):147-161.
- Dimkpa, C., Svatos, A., Dabrowska, P., Schmidt, A. and Boland, W. (2008). Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere*. 74:19-25
- Döbereiner, J. (1980). Forrage grasses and grain crops. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Ed. F. J. Bergensen. Wiley, J. and Sons, New York. 535-555.
- (A) Dowd, S., Sun, Y., Wolcott, R., Domingo, and A., Carroll, J. (2008). Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: Bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*. 5(4):459-472.
- (B) Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R., and Edrington, T. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rRNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*. 8:125-132.

- Droege, M., and Brendon, H. (2008). The genome sequencer FLXTM system-longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of Biotechnology*. 136(1-2):3-10.
- El-Tarabily, K., and Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil biology and Biochemistry*. 38:1505-1520.
- Espinosa, J., and Mite, F., Estado actual y futuro de la nutrición y fertilización del banano <http://www.ipni.net/> Consultado el 22 de agosto de 2010.
- Estrada, A., Gutiérrez, L., and Montoya, O. (2005). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 58(1):2601-2609.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Rubio, L., and Candela, M. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 26:69-78.
- Fedorov, D., Ivanova, E., Doronina, N., and Trotsenko, Y. A new system of degenerate oligonucleotide primers for detection and amplification of *nifH*D genes. *Microbiology*. 77(2):247-249.
- Feinstein, L., Jun, W., and Blackwood, C. (2009). Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(16):5428-5433
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the *bootstrap*. *Evolution*. 39:783-791.
- Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M. and Sagardoy, M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región de Sojera. *Cl. Suelo*. 23(1):31-37.
- Foster, R. (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 6:189-203.
- Franco, M. *Evaluación de características PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias. Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Granada. Granada - España. 2008.

- (A) Franco, M., (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Revista Peruana de Biología*. 16(1):115-118.
- (B) Franco, M., (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*. 16(2):239-242.
- Gaitán, D. and Perez, L. *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo. (Dendranthema grandiflora)*. Tesis pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencia. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2007.
- Galindo, T., Polanía, J., Sánchez, J., Moreno, N., Vanegas, J. and Holguín, G. (2006). Efecto de inoculantes microbianos sobre la promoción de crecimiento de plántulas de mangle y plantas de *Citrillus vulgaris* San Andrés Isla, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 11(1):83-97.
- García, I. Hynes, R. and Nelson, L. 2005. Role of cytokinins in plant growth by rhizosphere bacteria. PGPR: Biocontrol and Fertilization. pg 173-195.
- Garrido, M., *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del cesar en dos épocas climáticas*. Tesis de maestría en Biología Aplicada. Facultad de Ciencias. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá. 2007.
- Gavilán, J., Principales plagas y enfermedades del banano. Via on line: <http://www.galeon.com/bananasite/plagas.html>. Consultado el 30 de mayo de 2010.
- Getha, K., and Vikineswary, S. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28:303-310.
- Glickman, E., and Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2):793-796.
- Gómez, A., 2007. Producción limpia para un plátano más saludable. Agencia de Noticias y Tecnología de Colombia, Noticyt. Boletín número 3. semana del 24 al

30. Vía on line: <http://www.aciem.org/bancoconocimiento/b/boletinnoticyct/Boletin%20%20-%202007.pdf> . consulta realizada el 22 de mayo de 2009.

- González, M. Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas. Tesis Master en Fertilidad del Suelo. Instituto de Suelos. Universidad de Camagüey. Camagüey. 2000.
- Gonzalez-Franco, A., Robles-Hernández, L., Nuñez-Barrios, A., Strip, J., Crawford, D. (2009). Molecular and cultural analysis of seasonal actinomycetes in soils from *Artemisia tridentata* habitat. *International Journal of Experimental Botany*. 78:83-90.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Keerthi, B., Sandeep, D. et. al. (2010). En <http://dspace.icrisat.res.in/handle/10731/3593> .
- Gupta, N., Mishra, S., and Basak, U. (2009). Diversity of *Streptomyces* in mangrove ecosystem of Bhitarkanika. *Iranian Journal of Microbiology*. 1(3):37-42.
- Gupta, N., Sabat, J., Parida, R., and Kerkatta, D. (2007). Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Botanica Croatica*. 66(2):197-204.
- Gutiérrez V., Pinzón Á., Casas, J., and Martínez, M. (2008). Determinación de la actividad celulolítica del suelo proveniente de cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agronomía Colombiana*, 26(3):497-504.
- Haarmann, M. and Knol, J. (2006). Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:2359-2365.
- Habib, E., Scarsdale, N., and Reynolds, K. (2003). Biosynthetic origin of hygromycin A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(7):2065-2071.
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. and Ouhdouch, Y. (2008). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:2565-2575.
- Harada, N., Otsuka, S., Nishiyama, M., and Matsumoto, S. (2003). Characteristics of phototrophic purple bacteria isolated from a Japanese paddy soil. *Soil Science and Plant Nutrition*. 49(4):521-526.

- Hendricks, C. Doyle, J. and Hugley, B. (1995). A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Applied Environmental Microbiology*. 61:2016-2019.
- Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A., Heydrich, M., (2004). Caracterización de Rizobacterias Asociadas al Cultivo del Maíz en la Producción de Metabolitos del Tipo AIA, Sideróforos y Ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología*. VI(1): 6-13.
- Hernández, Emma. *Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en la rizosfera de plantas tolerantes a metales pesados*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Departamento de Microbiología. Instituto Politécnico Nacional. México. 2009.
- Hidenori, S., Hideo, T., and Hiuga, S. (1980) A new site-specific endonucleasa *StuI* from *Streptomyces tubercidicus*. *Gene*. 11(3-49): 219-225
- Higa, T. and Wididana, G. (1991). The Concept and Theories of Effective Microorganisms. P. 118-124. Proceedings of the first international conference on Kyusei nature farming, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., USA.
- Higa, T., and Parr, J. (1994). Beneficial and Effective microorganism for a Sustainable Agriculture and Environment. *International Nature Farming Research Center*. Japan. p2-26.
- Hopwood, D. (2006). Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome. *Annual Review of Genetics*. 40:1-23.
- Huang, X. and Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*. 9:868-877
- Imhoff, J. *The Prokaryotes – The Phototrophic Alpha - Proteobacteria*, 3a Ed. Editorial Springer, New York, 2006, p. 41-64
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2004). Resolución No. 00375 (27 de febrero de 2004).
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2006). Manual de Buenas Prácticas de Distribución y Manejo Insumos Agropecuarios. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. pp 12- 17 (cit., en: Mantilla, M. *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolim var. yoko*

ono) en período de enraizamiento. Tesis pregrado en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 2007.

- IPNI (International Plant Nutrition Institute) (2010). Requerimientos nutricionales del cultivo de banana. Consultado el 15 de noviembre de 2010 en <http://www.inpofos.org/>
- Jaizme-Vega, M., Rodríguez-Romero, A., and Piñero, M. (2003). Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagate banana. *Fruits*. 59(2): 83-90.
- Jia, J., Li, W., Chen, W., Nie, L. and Tan, H. (2000). Cloning, sequencing and function of *sanA*, a gene involved in nikkomycin biosynthesis of *Streptomyces ansochromogenes*. *Science in China*. 43(1):30-38.
- Jia, L., Tian, Y and Tan, H. (2007). SanT, a bidomain protein, is essential for nikkomycin biosynthesis of *Streptomyces ansochromogenes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362:1031-1036
- Jones, R., Robeson, M., Lauber, C., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009). A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology (ISME)*. 3:442-453
- Khamna, S., Yokota, A., and Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(4):649-655.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J., and Lumyong, S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. Isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soil. *EurAsian Journal of BioSciences*. 4:23-32.
- Kim, M., Choi, K., Yin, Ch., Lee, K., Im, W., Lim, J., and Lee, S. (2004). Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnology Letters*. 26:819-822.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16:111-120.

- Kloepper, J., Lifshitz, R. and Zablotowicz, R. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. 7(2):39-44.
- Knoll, C. Investigation of bacteriocins from lactic acid bacteria and their impact in winemaking. Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science. Stellenbosch University. 2007.
- Kónya, A., Szabó, Z., Láng, I., Barta, I., and Salát, J. (2008). Production of FK520 by *Streptomyces tubercidicus*. *Microbiological Research*. 163:624-632.
- LaClair, D. *Optimization and characterization of the growth of the photosynthetic bacterium Blastochloris viridis and brief survey of its potential as a remediative tool*. Dissertation submitted for the degree of Doctor of philosophy. University of Notre Dame. Notre Dame, Indiana. 2006.
- Laitila, A., Alakomi, H., Raaska, L., Mattila, T., and Haikara, A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds *in vitro* and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*. 93:566-576.
- Lara, C., Villalba, M., and Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. IX(2):6-14
- Larimer, F., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., *et. al.* (2004). Complete genome sequence of the metabolically photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*. 22:55-61.
- Lertcanawanichakul, M., and Sawangnop, S. (2008). A comparasion of two methods used for measuring antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology*. 5(2):161-171.
- Lezhava, A., Mizukami, T., Kajitani, T., Kameoka, D., Redenbach, M., Shinkawa, H., *et. al.* (1995). Physical Map of the Linear Chromosome of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*. 177(22):6492-6498.
- Liu, G., Tian, Y., Yang, H. and Tan, H. (2005). A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Molecular Microbiology*. 55(6):1855-1866
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F., and Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*. 35(18):1-10

- Lombardo-Aburto, E., Gonzalez-Saldaña, N., Castañeda-Narváez, J., Hernández-Bautista, V., and Hernández-Orozco, H. (2010). Brote de bacteremia por *E. faecalis* en un servicio de inmunología pediátrica en un hospital de tercer nivel. *Acta Pediátrica de Mexico*. 31(2):67-69.
- Lowe, D., and Arendet, E., (2004). The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing with Their Relationships to Antifungal Activity Mycotoxins and Gushing: A Review. *Journal of Institute Brewing*. 110(3):163-180.
- Lwin, M., and Ranamukhaarachchi. (2006). Development of Biological Control of *Ralstonia solanacearum* Through Antagonistic Microbial Populations. *International Journal of Agriculture and Biology*. 8(5):657-66.
- Ludden, P., and Roberts, G. (2002). Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research*. 73:115-118.
- Malboobi, M., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., Deljou, A., and Heravi, K., (2009). Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(8):1471-1477.
- Mantilla, C., Anaya, M., and Zumaqué, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. IX(2):6-14
- Mantilla, M. *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. yoko ono) en período de enraizamiento*. Tesis pregrado en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 2007.
- Manual de Lombricultura. http://www.manualdelombricultura.com/manual/agricultura_organica/agricultura_convencional.html. consulta realizada el 23 de marzo de 2009.
- Martín del Campo, C., Gómez, H., and Alaníz de la O, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad anteagónica y actividad bacteriogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis*, 6:1-17.
- Martínez, A. (2001). 500 Preguntas Sobre el Plátano. Corpoica. Librería Virtual. Vía on line. Consulta realizada 10 de febrero de 2009.

- Martínez, H., Peña, Y., and Espinal, C., (2006). La cadena de plátano en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No.102. Bogotá (Colombia): Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Vía on line: <http://www.agrocadenas.gov.co/platano/documentos/caracterizacionplatano.pdf>; Consulta realizada el 30 de mayo de 2010.
- Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Limura, Y., and Hayakawa, M. (2007). Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetologica*. 21(1):32-39.
- Matthews, C. (2006). *El caso de las plátanos desaparecidos – La FAO invita a la búsqueda de especies de plátanos silvestres*. FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Vía on line: <http://www.fao.org/newsroom/ES/news/2006/1000285/index.html>. Consulta realizada el 24 de mayo de 2009.
- McMillan, S. (2007). Promoting Growth With PGPR. The Canadian Organic Grower. Vía on line: http://www.cog.ca/documents/07SU_PGPR.pdf. Consulta realizada el 9 de marzo de 2010.
- Mejía, G., and Gómez, J. Los desechos generados por la industria bananera en Colombia. Seminario internacional gestión ambiental de residuos sólidos y peligrosos Siglo XXI. Vía on line: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxix.pdf>, consulta realizada el 14 de mayo de 2009.
- Mikán, J., Castellanos, D. (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. VI(001);58-71.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Estadísticas de la Cadena de Plátano en Colombia. 2010. Vía on line: http://www.agrocadenas.gov.co/platano/platano_reportes.htm Consulta realizada el 18 de septiembre de 2009.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa Nacional de Agricultura Orgánica. Introducción a la Agricultura Orgánica, 1ª Ed. Editorial del Norte, San José, C. R, 1991, p 4-8.

- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Sistema de Información de Precios del Sector Agropecuario SIPSA. 2010. Vía on line: <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/boletines/Costos2009trim3/Agricolas/Llanos%20Orientales/EC%20Plátano-grande.pdf>. Consulta realizada el 30 de mayo de 2010.
- Moreno, J., (2002). Evaluación de bokashi y microrrizas VAM en el desarrollo de plátano Curare Enano en vivero. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. [Escuela Agrícola Panamericana Zamorano](#). Honduras. 2002.
- Mukherjee, G. and Sen, S. (2007). Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Streptomyces venezuelae* P₁₀. *Current Microbiology*. 53:265-269.
- Oda, Y., Larimer, F., Chain, P., Malfatti, S., Shin, M., Vergez, L., et. al. (2008). Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments. [Proceedings of the National Academy of Sciences](#). 105(47): 18543-18548.
- Oskay, M., Tamer, A., and Azeri, C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolate from farming soils of Turkey. *American Journal of Biotechnology*. 3(9):441-446.
- Palencia, G., Gómez, R., and Martín, J. *Manejo Integrado del Cultivo de Plátano*. 1ª Ed. Editorial Produmedios, Bucaramanga-Colombia, 2006, p8-9.
- Palencia, G., Gómez, R., y Martín, J. *Manejo Sostenible del Cultivo de Plátano*. 1ª Ed. Editorial Produmedios, Bucaramanga-Colombia, 2007, p8.
- Paredes-Mendoza, M., and Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28(1):61-70
- Patiño, L., Bustamante, E., and Salazar, L. (2007) Efecto de Sustratos Foliares sobre La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Banano (*Musa x paradisiaca* L.) y Plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica*. 67(4):437-445.

- Patten, C. and Glick, B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* in indole acetic acid in development of host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3795–3801.
- Ponce T., Pérez O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. *Avance y Perspectiva*. 21:273-277.
- Pradhan, N and Sukla, L. (2005). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*. 5(10):850-854.
- Rabbani, M., Mirmohammad, H., and Karjoo, Z. (2007). Molecular detection of *Streptomyces griseus* isolated from Isfahan soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(19):3374-3379.
- Rajeswari, K. and Kasthuri, M. (2009). Molecular characterization of *Azotobacter* spp. *nifH* gene isolated from marine source. *African Journal of Biotechnology*. 8(24):6850-6855.
- Ramírez, M., Roveda, G., Bonilla, R., Cabra, L., Peñaranda, A., López, M., et. al. *Uso de Microorganismos con potencial como Biofertilizantes en el Cultivo de Mora*, 1ª Ed. Editorial Produmedios, Bogotá, Colombia, 2008, p. 34-35.
- Ramírez, P. and Cocha, J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. 10(1):67-77.
- Rico, M. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de pregrado en Biología. Facultad de Ciencias Biológica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2009.
- Rivera-Cruz, M., Trujillo, A., Córdova, G., Kohler, J., Caravaca, F., and Roldán, A., (2008). Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. *Soil Biology & Biochemistry*. 40: 3092-3095.
- Robert, E. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5):1792-1797.

- Rodríguez-Gaviria, P., and Cayón, G. (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana*. 26(2):256-265.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. and Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*. 287:15-21
- Rodríguez, S., Rodríguez, F. (2004). Protocolo para la extracción de ADN modificado de IAEA. Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM). Programa de Fisiología y Nutrición Animal. Corpoica Tibaitatá
- Roesch, L., Fulthorpe, R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A., Kent, A., *et.al.* (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology (ISME)*. 1:283-290.
- Rojas, A., Ramírez, M., Lora, R., Amézquita, E., Sánchez, L., García, B. *et. al.* *Fertilización en Diversos cultivos – Quinta aproximación*. Editorial Produmedios, Bogotá, Colombia, 1992, p. 19 - 22 y 37.
- Rojas, J., and Moreno-Sarmiento, N. (2008). Producción y Formulación de Prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz, (*Oryza zativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*. X(2):50-62.
- Romero, I. (2006). Diversidad y función de las Pirofosfatasas de Bacterias Fotosintéticas Púrpura No Sulfurosas. XXVI Congreso Nacional. Sociedad Mexicana de Bioquímica. Vía on line: <http://www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/Resumen-Invitados/IrmaRomero.pdf> consulta realizada el 4 de mayo de 2009.
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*. 11:3-11.
- Rosales, F., Pocasangre, L., Trejos, J., Serrano, E., Acuña, O., Segura, A., et al. (2006). Guía para el diagnóstico de la calidad y la salud de suelos bananeros. *XVII Reuniao Internacional da Associacao para a Cooperacao nas Pesquisas sobre banana no caribe e na America Tropical*. Santa Catarina – Brasil. Via on line: http://musalit.inibap.org/pdf/IN060649_es.pdf. Consulta realizada el 12 de mayo de 2009.

- Rozsa, C., Dupeyrón, D., Galego, N., Cyras, V. y Vázquez, A. Miscibilidad de mezclas poliméricas de polihidroxialcanoatos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 52(2):55-66.
- Ruiz, M., Urueña, M., (2009). Situación Actual y Perspectivas del Mercado del Plátano Economic Research Service – Ers Midas Crops. Componente de agronegocios – Programa MIDAS Octubre de 2009.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Samac, D., and Kinkel, L. (2001). Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Plant and Soil*. 235:35-44.
- Sastoque, E. *Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador*. Tesis de pregrado en Microbiología industrial, agrícola y veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2005.
- diversity of diazotrophic bacteria associated with the rhizosphere of a tropical arbor, *Melastoma malabathricum* L. *Microbes and Environments*. 24(2):81-87
- Sato, A., Watanabe, T., Unno, Y., Purnomo, E., Oosaki, M., and Shinano, T. (2009). Analysis of
- Schlatter, D., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S., and Kinkel, I. (2009). Resource Amendments Influence Density and Competitive Phenotypes of *Streptomyces* in Soil. *Microbial Ecology*. 57:413-420.
- Sembiring, L., and Goodfellow, M. (2008). Ecological approach to unravel *Streptomyces* diversity as an unsurpassed sources of natural bioactive products. *Microbiology*. 2(2):49-56
- Shrivastava, S., D'Souza, S., and Desai, P. (2008). Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. *Current Science*. 94(12):1595-1604.
- Solans, M. & Vobis, G. (2003). Actinomycetes saprofíticos asociados a la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. *Ecología Austral*. 13:97-107

- Sousa, C., Fermino, A., and Garrido M. (2008) Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Scientia Agricola*. 65(1):50-55.
- Stanier, R., Pfenning, N., and Trüpper, H. Introduction to the Phototrophic prokaryotes. In *The prokaryotes, A Handbook on the biology of bacteria: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3^{ra} edición. Springer. Singapore. 2006.
- Ström Katrin. *Fungal Inhibitory lactic Acid Bacteria*. (Doctoral Thesis on Agriculture Sciences). Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences. Swedish University. Uppsala, 2005.
- Strzelczyk, E. and Pokojaska-Burdziej (1984). Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant and soil*. 81:185-194.
- Suttiviriya, P., Vajrodaya, s., and Thamchaipenet, A. (2008). Production of plant growth agents from endophytic actinomycetes. En 34th Congress on Science and Technology of Thailand. http://www.scisoc.or.th/stt/34/sec_b/paper/STT34_B2_B0179.pdf
- Suutari, M., Rönkä, E., Lignell, U., Rintala, H., and Nevalainen, A. (2002). Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from water-damaged buildings. *FEMS Microbiology*. 39:77-84
- Swain, M., and Ray, R. (2009). Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*. 164:121-130.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599.
- Tapiero, A., y Rodríguez, S. (2007). Dispersión de *Ralstonia solanacearum* en suelos cultivados con plátano en el Piedemonte Llanero. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(1):52-60.
- Taurian, T., Anzuay, M., Angelini, G., Tonelli, M., Ludueña, L., Pena, D., Ibáñez, F., and Fabra, A., (2010). Phosphate-solubilizing penaut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*. 329:421-431

- Terry, E., Leyva, A., and Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*. VII(2):47-54.
- Toomey, G., (2004). Campaña de Colombia para salvar del *moko* a los plátanos. Via on line: http://www.cgiar.org/pdf/fedeplatano_spanish_final.pdf . Consultado el 30 de mayo de 2010.
- Trüpper, H., and Pfenning, N. Characterization and Identification of the anoxygenic phototrophic bacteria in The prokaryotes, A Handbook on the biology of bacteria: Archea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 3^{ra} edición. Springer. Singapore. 2006.
- Valero, N. Potencial biofertilizante de bacterias diazotrofas y solubilizadoras de fosfato asociadas al cultivo de arroz (*Oriza Sativa. L*). Tesis magister en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 2003.
- Vassilev, N., Vassileva, M., and Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trend. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:137-144.
- Visser, R., Holzapfel, W., Bezuidenhout, J., and Kotzé, J., (1986). Antagonism of Lactic Acid Bacteria Against Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(3):552-555.
- Ward, S., Hu, Z., Schirmer, A., Reid, R. Revill, P., Reeves, C., Petrakovsky, O., Dong, S., and Katz, L. (2004). Chalcomycin biosynthesis gene cluster from *Streptomyces bikiniensis*: novel features of an unusual ketolide produced through expression of the chm polyketide synthase in *Streptomyces fradiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 78(12):4703-4712.
- Will, C., Thürmer, A, Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schruppf, M., et al. (2010). Horizon-Specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(20):6751-6759.
- Woodward, D. (2003). Soil and Sustainability Effective Microorganism as Regenerative Systems in Earth Healing. Vía on line: <http://p2pays.net/compost/CompostTea/SoilandSustainability.pdf> consulta realizada el 15 de mayo de 2009.

- Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., regan, J., and Logan, B. (2008). Electricity generation by *Rhodopseudomonas palustris* DX-1. *Environmental Science Technology*. 42(11):41416-4151.
- Yanagida, F., Chen, Y., and Shinohara, T. (2005). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from soil in vineyards. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 51:313-318.
- Yanagida, F., Chen, Y., and Shinohara, T. (2006). Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. *Journal and General Applied. Microbiology*. 52: 21-28.
- Yasa, I., Cadirci, B., Kocyigit, A., and Öztürk, T. (2006). Enrichment and isolation of anoxygenic phototrophic bacteria in winogradsky column. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 23(1-2):71-73.
- Yoon, H., Kim, H., Lim, Y., Kim, H., Shin, D. (2000). Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9):3727-3734.
- Young, C. (1990). Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical- tropical soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 36(2):225-231.
- Zambrano, A., Martínez, G., Gutiérrez, Z., Manzanilla, E., Vicente-Villardón, J. and Demey, J. (2007). Marcador RAPD Asociado a la Resistencia a *Fusarium oxysporum* en *Musa*. *Interciencia*. 32(11): 775-779.
- Zapata, R. (2008). Avance de las enfermedades del bsv, *Erwinia*, *Mocus* y *Cumus virus* en el cultivo de banano ecuatoriano. Artículos Técnicos Agricultura. Vía on line:http://www.engormix.com/avance_enfermedades_del_bsv_s_articulos_1899_AGR.htm. Consulta realizada el 27 de mayo de 2009.
- Zhang, Y. Himmel, M. Mielenz, j. (2006). Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 24:452-481.
- Zhang, H., Sun, G., Li, X., Pan, H., and Zhang, Y. (2010). A new geldanamycin analogue from *Streptomyces hygroscopicus*. *Molecules*. 15:1161-1167.

-
- Zhou, Q., Li, K., Jun, X., and Bo, L., (2009). Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology*. 100: 3780-3786.
 - Zou, L., Chen, Y., and Yan, T. (2000). Ecological distribution and seasonal change of soil microorganisms in pure and mixed plantations. *Journal of Forestry Research*. 11(2):106-108.