

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**



**MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA ACTINOBACTERIAS CON ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO**

**TATIANA ORTIZ MARTINEZ  
VALERIA OCAMPO MURILLO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para optar al título de:  
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C.  
2013**

**MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA ACTINOBACTERIAS CON ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO**

**TATIANA ORTIZ MARTINEZ  
VALERIA OCAMPO MURILLO**

---

**Ingrid Schuler G. Ph.D  
Decano Académico**

---

**Janeth Arias P. M.Sc  
Director de Carrera**

**MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA ACTINOBACTERIAS CON ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE  
FÓSFORO**

**TATIANA ORTIZ MARTINEZ  
VALERIA OCAMPO MURILLO**

**APROBADO**

---

**Marcela Franco Correa. Ph.D  
Director**

---

**Luis Daniel Prada Salcedo  
Codirector**

---

**Marcela Rey Arévalo  
Jurado**

#### **NOTA DE ADVERTENCIA**

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

**Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.**

## AGRADECIMIENTOS

Le damos gracias primeramente a Dios por darnos fortaleza y sabiduría en los momentos difíciles, también a nuestros padres quienes nos apoyaron durante todo el trayecto con su tiempo, dinero y preocupación, a Pato por su hospitalidad, su comida y sobre todo por abrir las puertas de su casa durante esas largas noches, a mi mamá y Darío por ser incondicionales en todo instante, a Elías y Blanca, mis abuelos, y a mi papi por su apoyo y oraciones, a Omar por sus abrazos y apoyo en todo momento. Gracias a Harvey porque a pesar de estar en tesis apoyó mis idas al estadio, por escucharme siempre y por enseñarme que con llorar no se solucionan las cosas. Padre te amo. A mi mama por todo lo que hizo durante la tesis, además de aguantarme el mal genio, correr cuando algo se me quedaba en la casa o consentirme cuando lloraba, te amo mami, a Juanse el amor más grande de mi vida junto con Toruk y a mi sobrino que aún no nace.

Inmensamente gracias a Catalina Rondón, Camila Amorocho, por su colaboración durante el proceso, por los ánimos que nos daban y los momentos de alegría que compartimos.

Gracias a nuestros amigos Nicolás Cárdenas, Laura Perilla, Ale Mantilla, Vanessa Chavarro, Juliana Betancourt, Carolina Prieto, Alejandra Ferreira, Admery, Ivan, Carel y los que nos faltan por nombrar por sus palabras de aliento, también por las noches que algunos pasaron a nuestro lado ayudándonos, por abrazarnos en los momentos desesperantes por proponernos otros planes y despejarnos de la TESIS.

Gracias a UNIDIA y a María Ximena, quien abrió las puertas del laboratorio, por ayudarnos con sus consejitos y demás.

Gracias a Marce Rey por brindarnos su apoyo, facilitarnos los equipos, escucharnos y corregirnos.

Gracias a nuestro querido codirector Daniel Prada, por la fuerza que nos daba cada vez que nos decían REPITEN, por estar a nuestro lado en los momentos difíciles, por consentirnos tanto, siempre seremos sus princesitas. Dani te queremos muchísimo.

Gracias Valeria Ocampo (Animalito), por compartir este trayecto tan largo y duro conmigo, por las pataletas, y las lloradas, la quiero resto, ojala esta amistad se lleve por mucho tiempo más, Dios la bendiga siempre.

Gracias a Tats mi animal porque cada vez que lloraba me daba fuerzas para no llorar y poder burlarme de usted, por escuchar y dar siempre buenos consejos y por aguantar las rabietas. La quiero

Gracias a Marcela Franco, porque no solo nos enseñó un proyecto o actinobacterias, si no por el contrario, nos enseñó a valorar, a ser fuertes, nos enseñó que lo personal siempre se debe diferenciar de lo laboral, nos enseñó a no rendirnos por más duras que fueran las situaciones, nos enseñó que el carácter se debe fortalecer, nos enseñó a ser nosotras sin importar a quien le gustara o no, y lo más importante nos dejó conocer gran parte de ella. Gracias Marcela por tu paciencia, tus regaños, tus correcciones y demás, te llevamos en el corazón, te queremos.

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	X
<b>INDICIE DE TABLAS</b>	VII
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	VIII
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	2
<b>3. OBJETIVOS</b>	3
3.1 Objetivo general	3
3.2 Objetivos específicos	3
<b>4. MARCO TEORICO</b>	4
4.1 Métodos de conservación	4
4.2 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal	5
4.3 Actinobacterias	6
4.4 Solubilización de fósforo insoluble	6
<b>5. METODOLOGÍA</b>	8
5.1 Microorganismos	8
5.2 Liofilización	8
5.3 Congelación	8
5.4 Arena estéril	9
5.5 Sílica gel	9
5.6 Arcilla	9
5.7 Transferencia periódica	10
5.8 Cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo	10
<b>6. RESULTADOS</b>	11
<b>7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	16
<b>8. CONCLUSIONES</b>	25
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	26
<b>ANEXO 1 PRUEBA T PARA MUESTRAS RELACIONADAS</b>	33
<b>ANEXO 2 ANALISIS ESTADISTICO</b>	36
<b>ANEXO 3 MEDIOS DE CULTIVO</b>	54
<b>ANEXO 4 CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA</b>	55
<b>ANEXO 5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO</b>	65
<b>ANEXO 6 ANALISIS DE COSTOS</b>	67

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>TABLA 1. Viabilidad obtenida a partir de los métodos de conservación a largo plazo para los aislamientos de actinobacterias al inicio y al final de la evaluación</b>	11
<b>TABLA 2. Viabilidad obtenida a partir de los métodos de conservación a mediano plazo para los aislamientos de actinobacterias al inicio y al final de la evaluación</b>	12
<b>TABLA 3. Evaluación de la solubilización de fósforo a partir de los tratamientos</b>	14
<b>TABLA 4. Viabilidad obtenida para recuento en placa y recuento en cámara de Neubauer de los métodos de conservación a mediano plazo</b>	17
<b>TABLA 5. Viabilidad, concentración de fósforo soluble y costos de los tratamientos evaluados</b>	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. Reacción de control sin fuente de fósforo, blanco, control abiótico y replica de MCR24.</b>	13
<b>FIGURA 2. Morfología del aislamiento T3A al inicio y al final de la evaluación</b>	14
<b>FIGURA 3. Células muertas teñidas con azul de tripán 0,4% (p/v)</b>	18
<b>FIGURA 4. Células VIVAS teñidas con azul de tripán 0,05% (p/v)</b>	18
<b>FIGURA 5. Solubilización de fósforo del aislamiento T3C en Arcilla</b>	22
<b>FIGURA 6. Solubilización de fósforo del aislamiento T3A en Arcilla</b>	22

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1 PRUEBA T PARA MUESTRAS RELACIONADAS</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO 2 ANALISIS ESTADISTICO</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO 3 MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO 4 CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 6 ANALISIS DE COSTOS</b>	<b>67</b>

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes métodos de conservación para actinobacterias caracterizadas por su actividad solubilizadora de fósforo. Los métodos de conservación se evaluaron a 3 diferentes tiempos; largo, mediano y corto plazo, dentro de los cuales se encuentran: congelación y liofilización, arcilla, sílica y arena; y transferencia periódica respectivamente. Para ello se usaron 15 aislamientos de 3 localidades diferentes (La Vega, Maní y Tota) y un banco de referencia de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana. Se prepararon todos los inóculos en solución salina al 0,85% (p/v) los cuales se ajustaron a una concentración de  $10^8$  cel/mL, seguido a ello se inocularon los viales de cada método de conservación con sus respectivos crioprotectantes, glicerol 20% (v/v), 30% (v/v) para congelación y skim milk 18% (p/v) para liofilización y Sílica gel. Los métodos a mediano plazo se realizaron de igual manera, el inóculo se agregó a 10 perlas de arcilla, 10 g de arena y 5 g de Sílica, posteriormente se almacenaron a 4°C. El método de corto plazo se evaluó en agar avena (15 g/L). La evaluación se realizó mediante recuento directo en cámara de Neubauer por la técnica de azul de tripán y recuento en placa en agar Czapek, además de la caracterización macroscópica y microscópica de cada aislamiento en transferencia periódica. Los resultados de viabilidad fueron más efectivos realizando recuento directo en cámara de Neubauer tanto para largo como para mediano plazo; y la actividad solubilizadora de fósforo se mantuvo más estable cuando se almacenaron las actinobacterias en métodos a largo plazo.

## 1. INTRODUCCIÓN

Un buen método de conservación debe cumplir con tres objetivos principales: mantener las cepas puras, que durante el tiempo de conservación el 70% de las células permanezca viables o que no baje más de dos unidades exponenciales y que se mantengan genéticamente estables (García 2001). Existen diversos métodos de conservación entre los que se encuentran congelación y liofilización; sílica gel, arcilla y arena; y transferencia periódica, éstos se clasifican según el tiempo en largo, mediano y corto plazo respectivamente.

La elección de un método de conservación se basa principalmente en la viabilidad, pureza y los costos que genere el proceso (Parra 2006), por lo tanto un método puede ser más eficiente para un microorganismo en específico. Es necesario entonces encontrar métodos que permitan la conservación de microorganismos que presenten características de gran interés como producción de metabolitos secundarios o como en este caso la solubilización de fósforo.

El fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento de plantas, sin embargo se encuentra de forma no disponible en el suelo, es decir, las plantas no pueden tomarlo para su desarrollo, para ello existen varias formas de transformar el fósforo no disponible a disponible como la solubilización que por medio de la producción de ácidos orgánicos se libera el fósforo inorgánico como los ortofosfatos que ya pueden ser tomados por las plantas. Existen diferentes microorganismos capaces de solubilizar fósforo como las actinobacterias que son bacterias Gram positivas filamentosas y se encuentran ampliamente distribuidas en distintos tipos de ambientes como el suelo y aguas, aunque también se pueden encontrar en el hombre; son microorganismos heterótrofos, aerobios y su temperatura óptima de crecimiento es de 25 - 30°C (Franco-Correa 2008). No se han reportado métodos de conservación específicamente para actinobacterias, por lo tanto el objetivo de éste trabajo es encontrar el mejor método de conservación para actinobacterias que presentan actividad solubilizadora de fósforo.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El fósforo soluble es esencial para el crecimiento vegetal, el cual se encuentra en dicha forma debido a la acción de microorganismos como las actinobacterias quienes poseen la característica de solubilizar el fósforo mediante la producción de ácidos orgánicos. Las actinobacterias han sido descritas como Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Franco-Correa 2009) pero son pocos los estudios que se han publicado con respecto a estos microorganismos.

Por el interés ecológico mencionado anteriormente, es importante llevar a cabo métodos de conservación que permitan mantener la actividad metabólica durante tiempos específicos sin alterar sus características con el fin de establecer el mejor procedimiento para la conservación de las actinobacterias e implementar un método estándar que aún no ha sido reportado en estos microorganismos, teniendo en cuenta los costos que genera cada método, además con esta investigación se puede mantener las cepas para en un futuro pensar en estudios posteriores como la producción de biofertilizantes a base de actinobacterias que eliminarían del mercado fertilizantes de tipo químico, ya que la adición de éstos al suelo elevan costos de producción, deterioran el medio ambiente y además sus compuestos se inmovilizan rápidamente (Chen 2006, Sundara 2002, Xia 2008).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Seleccionar el mejor método de conservación para actinobacterias solubilizadoras de fósforo aisladas a partir de muestras de suelo de 3 localidades de Colombia.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la viabilidad de las cepas después del tiempo de conservación en cada método evaluado.
- Evaluar la actividad solubilizadora de fósforo después del tiempo de conservación en cada método evaluado.
- Determinar la pureza después del tiempo de conservación en cada método evaluado.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Métodos de conservación

Existen varios métodos de conservación para microorganismos y los 3 objetivos principales de éstos son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables (García 2001). Para alcanzar estos objetivos es necesario investigar el microorganismo que se va a tratar debido a la enorme diversidad microbiana ya que cada microorganismo soportará determinados métodos de conservación mejor que otros, por ello no existe un solo método en general de cada microorganismo (García 2001) por lo tanto se busca estandarizar un método para un microorganismo en específico como las actinobacterias solubilizadoras de fósforo. Los efectos medibles, en cuanto a sensibilidad, se definen como la pérdida de la productividad del microorganismo respecto a la viabilidad, por lo tanto se proponen diferentes métodos para medir los efectos sobre el microorganismo (Hancocks 2010).

Los métodos de conservación para efectos de esta investigación se dividen en tres: largo plazo, mediano plazo y corto plazo; y los tiempos de conservación son 1 año, 6 meses y cada mes respectivamente.

En los métodos a largo plazo se encuentra la liofilización como uno de los métodos de mayor elección debido a sus numerosas ventajas, entre las que se puede resaltar la posibilidad de minimizar el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más (Burguet 2012). La liofilización consiste en la eliminación de la cantidad total de agua de la muestra por congelación y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío, la sublimación es el paso del estado líquido al gaseoso sin pasar por un estado sólido. Este método de deshidratación resulta en un compuesto soluble fácilmente rehidratable (Chen 2006), sin embargo no todas las cepas sobreviven al proceso, las principales causas de pérdida de viabilidad son probablemente la formación de cristales de hielo y la alta osmolaridad. La supervivencia de las células depende de muchos factores como la adición de conservantes y las condiciones durante la rehidratación (Font de Valdez 1983).

La crioconservación es otro método a largo plazo donde el agua no está disponible para el microorganismo por la congelación, la cual se puede clasificar de acuerdo a la temperatura de almacenamiento (Perry 1998), generalmente en laboratorios con congeladores estándar se usan temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$ ; temperaturas de  $-70^{\circ}\text{C}$  se alcanzan con congeladores de temperatura ultra-baja y  $-140^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  se alcanzan con nitrógeno líquido (Perry 1998), a temperaturas bajas como las que se alcanzan con el nitrógeno líquido, la viabilidad celular y los sistemas biológicos se consideran genéticamente estables (Heckly 1978). El almacenamiento de los microorganismos a temperaturas entre  $-60^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  tiene buen

resultado en cuanto viabilidad y su uso depende de la disposición que el laboratorio tenga de nitrógeno líquido. Generalmente a temperaturas por encima de  $-30^{\circ}\text{C}$  los resultados no son buenos por la formación de mezclas eutécticas y por lo tanto la exposición de las células a altas concentraciones de sal (Perry, 1998).

Los métodos a mediano plazo se dividen en 3 principalmente, entre los que se encuentran: sílica gel, arcilla y arena.

La sílica gel es una forma porosa de dióxido de silicio que se fabrica sintéticamente a partir de silicato sódico. Este método se ha reportado en hongos esporulados y se usa cuando la liofilización o el nitrógeno líquido no están disponibles (Nakasone 2004). Perkins (1962) demostró que los hongos esporulados conservados en sílica gel con Skim Milk se pueden mantener viables de 4-5 años. Generalmente la viabilidad después del tiempo de almacenamiento depende de la cepa y del medio de cultivo utilizado. La ventaja de este método es que impide el crecimiento y el metabolismo del microorganismo (Nakasone 2004).

El uso de arena estéril es un método utilizado para la conservación de hongos como *Rhizoctonia* (Nakasone 2004). La sequedad del suelo genera latencia al microorganismo ya que al no disponer de agua inhibe el crecimiento del mismo.

La transferencia periódica reportada como un método alternativo a corto plazo (García 2001) es almacenar la cepa en forma de cultivo activo en el medio, sin embargo una de las desventajas es la inestabilidad genética producida por los pases sucesivos, además de que no pueden permanecer mucho tiempo en el medio de cultivo ya que al seguir activas excretan metabolitos que se acumulan y generan toxicidad, provocando el envejecimiento y muerte celular, siendo así el peor método para mantener la estabilidad genética, puesto que al estar creciendo se presenta una alternancia de generaciones y al cabo del tiempo las células que están en almacenamiento serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características (García 2001).

#### **4.2 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal**

Existen varios grupos microbianos que poseen la capacidad de promover el crecimiento vegetal por diferentes actividades como la fijación de nitrógeno, la producción y liberación de fitohormonas como el ácido indolacético (Sánchez 2005) y la solubilización de fósforo; dentro de éstos se encuentran unos de los más reportados como: *Streptomyces*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Oviedo

2005); dentro del género *Pseudomonas* y *Azospirillum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense* (Oviedo 2009, Bashan 1999) son los microorganismos de mayor relevancia, puesto a que han demostrado una alta capacidad de solubilizar fracciones orgánicas e inorgánicas del fósforo total presente en el suelo (Oviedo 2005) y fijar el nitrógeno atmosférico mediante asociaciones no simbióticas como la relación benéfica entre microorganismos diazotróficos y la planta (Franco-Correa 2008).

Se ha comprobado que existen mecanismos de suministro de fosfatos requeridos por las plantas, esto gracias a la actividad de microorganismos capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos mediante la producción de ácidos orgánicos, agentes quelantes, disminución del pH del suelo y disposición de fosfatos contenidos en la materia orgánica del suelo, a través de la liberación de enzimas hidrolíticas como fosfatasa, fitasa y fosfonatasa (Sánchez 2005).

### **4.3 Actinobacterias**

Las actinobacterias son bacterias filamentosas Gram positivas, dotadas de un micelio verdadero como los hongos pero difieren en sus características de este grupo de microorganismos ya que su pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos y su material genético es principalmente procariota (Macas 2012). El porcentaje Guanina y Citosina de las actinobacterias es alta en comparación con otros microorganismos 51 - 78% GC (Franco-Correa 2008), sin embargo se ha reportado que *Frankia* tiene un porcentaje entre el 66 - 77% GC (Bautista 2008), esta característica le brinda a este grupo de microorganismos estabilidad en su molécula de ADN a condiciones adversas.

Podemos encontrar estos microorganismos en diferentes ambientes tanto marinos (Balagurunathan 1993) como terrestres, siendo el suelo el principal ambiente donde se encuentran presentes estas bacterias y dependen de 3 factores que influyen en su distribución: el pH, la temperatura y el tipo de suelo (Franco-Correa 2008), ya que son capaces de degradar materia orgánica, además son objeto de estudio ya que la mayoría de antibióticos y fármacos usados en la actualidad se producen usando miembros de este grupo taxonómico (Balagurunathan 1993).

### **4.4 Solubilización de fósforo insoluble**

El fósforo es un nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas y otros organismos, por lo tanto limitan la producción de los cultivos, una de sus funciones principales es intervenir en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Coyne 2009). El suelo contiene en promedio 0,02 a 0,5 % del fósforo total, del cual sólo el 1% es disponible para que la planta lo pueda asimilar (Chuang 2006). Las plantas deben absorber el fósforo del suelo, donde se encuentra en muy baja

concentración, normalmente en un rango entre 5 – 30 mg/kg de suelo, esto se debe a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el aluminio y el hierro dependiendo del pH que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Como es un nutriente esencial y su forma asimilable no está presente en gran cantidad en el suelo, se busca optimizar la aplicación de fertilizantes con la adición de bacterias fosfato solubilizadoras.

La actividad fosfato solubilizadora está determinada por la capacidad bioquímica microbiana de producir ácidos orgánicos que por medio de los grupos carboxílicos quelan cationes unidos a fosfatos convirtiéndolos en formas solubles, aunque la producción de ácidos orgánicos es uno de los mayores factores responsables en este proceso no es el único mecanismo para solubilizar fosfatos (Bobadilla 2008), existen otros mecanismos como óxido reducción, producción de sideróforos, reducción de formas minerales de fosfato férrico y producción de fosfatasas alcalinas, ácidas y neutras (Martinez 2010). En la literatura se dice que la producción de ácidos orgánicos como el oxálico, el cítrico, el láctico, entre otros, se dan en el suelo como resultado de la descomposición de la materia orgánica dependiendo del microorganismo que lleve a cabo este proceso. Los ácidos orgánicos permiten que haya un proceso de solubilización debido a que su producción implica un descenso del pH, los microorganismos toman la glucosa y la fermentan produciendo ácidos como el glutámico que se dan por la ruta de las pentosas (Collavino 2010).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Microorganismos

Se seleccionaron 15 aislamientos de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana para el estudio, las cuales presentan actividad solubilizadora de fósforo según Prada-Salcedo (2013).

### 5.2 Liofilización

Este método a largo plazo se llevó a cabo mediante el uso de un liofilizador LABCONCO FREEZE DRY SISTEM / FREE ZONE 4.5 el cual se llevó a una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$ , los viales que se usaron tienen una capacidad de 2,5 mL y como crioprotector se usó Skim Milk de Oxoid al 18% y se realizaron inóculos en solución salina al 0,85% (p/v) dejándolos a una concentración de  $10^8$ - $10^9$  cel/mL (García 2001). Para ello se realizaron recuentos en cámara de Neubauer, efectuando una tinción con azul de tripán al 0,05% con el fin de diferenciar las células vivas de las células muertas (Cardona 2005), finalmente el inóculo con el crioprotector se dejó a una proporción 1:1. Seguido a ello, se sellaron los viales con una grafadora y se almacenaron a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  (García 2001). Para su reactivación se tomaron 0,5 mL de solución salina con una jeringa de 3 mL Becton Dickinson y se agregaron al liófilo en condiciones de esterilidad, luego se agitaron alrededor de 30 segundos a 1 minuto para realizar un recuento directo en cámara de Neubauer con azul de tripán, seguido a ello se llevó a cabo una siembra en agar Czapek (Franco-Correa 2008) de la dilución anterior y posterior del exponente obtenido en el recuento directo para confirmar la viabilidad.

### 5.3 Congelación

Es también llamado criopreservación y se clasifica como método a largo plazo. Para llevar a cabo el proceso se utilizaron eppendorf de 1,5 mL, para ello se prepararon dos concentraciones de glicerol en agua destilada: glicerol al 20% (p/v) y glicerol al 30% (p/v) teniendo en cuenta que el glicerol (Glicerina MOL LAB. QUIMIOMETRICAS) está a una concentración de 99,5%, seguido a ello se prepararon los inóculos en solución salina al 0,85% (p/v) realizando recuento en cámara de Neubauer con la técnica de azul de tripán (Cardona 2005), para lograr diferenciar células vivas de células muertas y ajustar el inóculo a una concentración de  $10^8$ - $10^9$  cel/mL (García 2001), por último el inóculo junto con el crioprotector se dejaron a una proporción 1:1, a continuación se guardaron los eppendorff de glicerol al 20% (p/v) a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  y los eppendorf de glicerol al 30% (p/v) a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  (Perry 1998). Para su reactivación se tomó un eppendorff de cada una de las concentraciones y se realizó un recuento directo en cámara de Neubauer con

azul de tripán, seguido a ello se llevó a cabo una siembra en agar Czapek (Franco-Correa 2008) de la dilución anterior y posterior del exponente obtenido en el recuento directo para confirmar la viabilidad.

#### **5.4 Arena estéril**

Es un sustrato el cual ha sido estudiado para conservación de hongos, específicamente patógenos; sin embargo en este estudio se utilizó con actinobacterias. Se tomaron 10 g de arena que se depositaron en viales con capacidad de 50 mL y se esterilizaron a 120°C durante 15 minutos. Por otra parte se realizó un recuento en cámara de Neubauer con la técnica de azul de tripán para diferenciar células vivas de células muertas (Cardona 2005) y de este modo ajustar el inóculo a una concentración de  $10^8$ - $10^9$  cel/mL (García 2001). Se tomó 1 mL del inóculo y se agregó a 10 g de arena estéril para posteriormente almacenarlos a una temperatura de 4°C (García 2001) aproximadamente. Para su reactivación se tomó 1 g de la muestra y se agregó a 9 mL de solución salina, se realizó un recuento directo en cámara de Neubauer con azul de tripán, seguido a ello se llevó a cabo una siembra en agar Czapek (Franco-Correa 2008) de la dilución anterior y posterior del exponente obtenido en el recuento directo para confirmar la viabilidad.

#### **5.5 Sílica gel**

Se tomaron 5 g de Sílica y se introdujeron en viales con capacidad de 50 mL, se taparon con papel aluminio y se esterilizaron a 180°C durante 90 minutos, después se dejaron enfriar y se colocaron en una bandeja con hielo durante 24 horas (Nakasone 2004, Perkins 1962), posteriormente se realizó el recuento en cámara de Neubauer para ajustar la concentración del inóculo a  $10^8$ - $10^9$  cel/mL mediante la técnica de azul de tripán con el fin de diferenciar células vivas de células muertas (Cardona 2005). Se agregaron 0,7 mL del inóculo a los 5 g de Sílica y se almacenaron a 4°C (García 2001). Para la reactivación se tomó 1 g de Sílica y se realizó un recuento directo en cámara de Neubauer con azul de tripán, seguido a ello se llevó a cabo una siembra en agar Czapek (Franco-Correa 2008) de la dilución anterior y posterior del exponente obtenido en el recuento directo para confirmar la viabilidad.

#### **5.6 Arcilla**

Se tomaron 2-3 g de Sílica y se colocaron en un vial de 50 mL, seguido a ello se colocó algodón sobre la Sílica. En otro vial se colocaron 10 perlas de arcilla y se mandaron a esterilizar con calor seco a 180°C durante 2 horas. Por otra parte se realizó el recuento en cámara de Neubauer para ajustar la concentración del inóculo a  $10^8$ - $10^9$  cel/mL mediante la técnica de azul de tripán para diferenciar células vivas de células muertas (García 2001). Luego se colocaron las perlas de arcilla en el inóculo durante 5 minutos en condiciones de esterilidad,

tiempo que permitió la adsorción, a continuación se colocó en el vial que contiene la Sílica junto con el algodón, se sellaron y se almacenaron a 4°C (García 2001). Para su reactivación se tomaron todas las perlas de cada vial y se realizó un recuento directo en cámara de Neubauer con azul de tripán, seguido a ello se llevó a cabo una siembra en agar Czapek (Franco-Correa 2008) de la dilución anterior y posterior del exponente obtenido en el recuento directo para confirmar la viabilidad.

### **5.7 Transferencia periódica**

Es el método más simple y más utilizado para la conservación a corto plazo de bacterias, consiste en la transferencia periódica del cultivo en un medio líquido o sólido y su incubación a temperatura adecuada hasta la obtención del crecimiento (Freire 1999), para ello se sembraron en agar avena (Franco-Correa 2008) los 3 principales aislamientos de actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo incubándolas a 25 °C, a los 8 días se realizó caracterización macroscópica y microscópica de cada uno. Este procedimiento se repitió mensualmente durante 4 meses.

### **5. 8 Cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo**

Se tomó un Erlenmeyer de 100ml, al cual se le adicionaron 18 ml de medio NBRIIP (Anexo 3), y 2 ml de inóculo ajustado a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml, a continuación se incubaron a 23°C y 120 rpm durante 5 días. Luego del tiempo de incubación, cada una de las muestras se llevó a centrifugar por 15 minutos a 5000 rpm, posteriormente se tomó el sobrenadante y se realizó la cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo de los 3 aislamientos que presentan mayor Solubilización según lo reportado por Prada-Salcedo (2013) las cuales son MCR24, T3A y T3C; este proceso se realizó por triplicado; la cuantificación se realizó con el test SPECTROQUANT de Merck® (Murphy y Riley 1962). Con base a las instrucciones brindadas por el test se agregaron 5 gotas de Reactivo PO4-1 y una microcucharada de reactivo PO4-2 (medida proporcionada por el kit), a 5 ml de muestra, seguido a ello se agitó, hasta que el reactivo se disolviera completamente. Para el desarrollo de esta prueba, se preparó una curva patrón con concentraciones conocidas de ortofosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), según el protocolo 365.2 de la EPA (Anexo 5).

## 6. RESULTADOS

A partir de las cepas del banco de actinobacterias de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana se escogieron los mejores aislamientos con actividad solubilizadora de fósforo según lo reportado por Franco-Correa (2008) y Prada-Salcedo (2013). Para el tratamiento donde se utilizó la congelación, la evaluación se dividió según la temperatura de almacenamiento y la concentración del crioprotector según lo propuesto por Hubálek (2003) así:

- congelación rápida a -80°C con glicerol al 30%(v/v)
- congelación lenta a -20°C con glicerol al 20%(v/v).

**Tabla 1.** Viabilidad obtenida a partir de los métodos de conservación a largo plazo para los aislamientos de actinobacterias al inicio y al final de la evaluación\*

Aislamientos	Promedios de Rcto. inicial (cel/mL)	Promedios de Rcto Liofilización (cel/mL)	Promedios de Rcto. inicial (cel/mL)	Promedios de Rcto Glicerol 20% (cel/mL)	Promedios de Rcto. inicial (cel/mL)	Promedios de Rcto Glicerol 30% (cel/mL)
MCR1	1,00E+09	6,3E7 a	1,00E+09	4,3E7 a	1,00E+09	1,6E8 b
MCR9	4,00E+08	1,3E8 b	1,00E+09	3E8 c	4,00E+08	1,4E7 a
MCR24	3,00E+08	1E8 a	7,00E+08	1,3E8 a	3,00E+08	7E7 a
MCR26	2,00E+08	9E7 a	6,00E+08	9,3E7 a	2,00E+08	9,2E8 b
L3A	8,00E+08	9,6E7 b	1,00E+09	2E8 c	8,00E+08	7,3E6 a
L4B	2,00E+08	9,3E7 b	9,00E+08	1E8 b	2,00E+08	6,6E6 a
L4C	1,00E+09	1E8 a	5,00E+08	9,6E7 a	1,00E+09	3E8 b
M2A	1,00E+09	4E7 ab	1,00E+08	5,3E7 b	1,00E+09	6,8E6 a
T1B	1,00E+09	9,3E7 a	1,00E+09	1E8 a	1,00E+09	7,6E7 a
T1C	1,00E+09	1E8 a	1,00E+09	1E8 a	1,00E+09	7,3E7 a
T1J	2,00E+08	2E8 c	1,00E+08	7,3E7 b	2,00E+08	5,8E6 a
T3A	2,00E+09	1,6E8 b	1,00E+09	1E8 ab	2,00E+09	6,5E7 a
T3B	1,00E+09	1,6E8 a	1,00E+09	8E7 a	1,00E+09	1,5E8 a
T3C	1,00E+09	1E8 a	1,00E+09	9,3E7 a	1,00E+09	7,8E7 a
T3D	2,00E+08	1E8 b	6,00E+08	9,6E7 b	2,00E+08	6,6E7 a

\* Los métodos de conservación más efectivos para cada aislamiento se presentan en rojo según la agrupación de medias de Tukey.

**Tabla 2.** Viabilidad obtenida a partir de los métodos de conservación a mediano plazo para los aislamientos de actinobacterias al inicio y al final de la evaluación\*

Aislamientos	Promedios Rcto. Inicial (cel/mL)	Promedios Rcto Arcilla (cel/mL)	Promedios Rcto. Inicial (cel/mL)	Promedios Rcto Arena (cel/mL)	Promedios Rcto. Inicial (cel/mL)	Promedios Rcto Sílica (cel/mL)
MCR1	3,00E+08	8,00E+07 ab	1,00E+08	1,00E+08 b	1,00E+08	6,00E+07 a
MCR9	2,00E+08	5,00E+07 a	1,00E+08	1,00E+08 b	1,00E+08	5,00E+07 a
MCR24	1,00E+08	1,00E+08 a	3,00E+07	9,00E+07 a	3,00E+07	7,00E+07 a
MCR26	4,00E+08	8,00E+07 a	4,00E+08	1,00E+08 a	4,00E+08	8,00E+07 a
L3A	2,00E+08	7,00E+07 a	3,00E+08	9,00E+07 a	3,00E+08	7,00E+07 a
L4B	3,00E+07	1,00E+08 a	3,00E+07	9,00E+07 a	3,00E+07	4,00E+04 a
L4C	2,00E+08	5,00E+07 a	2,00E+07	6,00E+07 a	2,00E+07	4,00E+07 a
M2A	3,00E+08	1,00E+08 b	4,00E+08	1,00E+08 b	4,00E+08	4,00E+07 a
T1B	8,00E+07	3,00E+08 a	2,00E+08	5,00E+08 b	2,00E+08	6,00E+07 a
T1C	4,00E+08	7,00E+07 a	2,00E+07	5,00E+08 b	2,00E+07	8,00E+07 a
T1J	3,00E+08	3,00E+07 a	2,00E+07	8,00E+07 a	2,00E+07	6,00E+07 a
T3A	1,00E+08	1,00E+08 a	4,00E+08	2,00E+08 b	4,00E+08	6,00E+07 a
T3B	2,00E+08	7,00E+07 a	2,00E+07	2,00E+08 b	2,00E+07	9,00E+07 a
T3C	1,00E+08	7,00E+07 a	4,00E+08	2,00E+08 b	4,00E+08	7,00E+07 a
T3D	3,00E+07	4,00E+07 a	2,00E+07	8,00E+07 b	2,00E+07	5,00E+07 ab

\* Los métodos de conservación más efectivos para cada aislamiento se presentan en rojo según la agrupación de medias de Tukey.

Para evaluar la viabilidad de cada uno de los aislamientos en los diferentes métodos de conservación se usaron dos técnicas diferentes, recuento en placa y recuento en cámara de Neubauer con azul de tripán al 0,05% (Cardona 2005), mediante un análisis estadístico T-Student se determinó que no hay diferencias significativas (Anexo 1) entre recuento en placa y recuento en cámara de Neubauer para largo plazo, sin embargo el análisis arrojó diferencias significativas para 2 métodos de conservación a mediano plazo, arcilla y sílica gel (Anexo 1).

Además se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un  $\alpha$  del 0.05 y posteriormente una prueba de comparación de medias de Tukey (Anexo 2) para determinar el mejor método de conservación a cada uno de los aislamientos como se observa en la tabla 1 y 2. En esta tabla se pueden observar los promedios del recuento en cámara de Neubauer y una letra (a, b ó c) correspondiente a los grupos formados por la prueba de comparación de medias; sin embargo, algunos de los aislamientos no presentan diferencias por lo tanto se codificaron con la misma letra en los tres métodos de conservación evaluados.

Se tomaron los tres aislamientos de actinobacterias que presentaron mayor actividad solubilizadora de fósforo según los resultados reportados por Prada-Salcedo (2013) a partir de fosfato tricálcico como fuente inorgánica de fósforo. El protocolo para la determinación de fósforo soluble en este estudio se efectuó según lo propuesto por el protocolo 365.2 de la EPA midiendo la absorbancia a 880 nm, debido a que la curva patrón se realizó a esta absorbancia (Anexo 5). El blanco que se configuró para la reacción fue agua destilada desionizada adicionándole los reactivos del Kit Spectroquant Merk®, adicionalmente se montaron por triplicado dos controles diferentes, control abiótico y NBRIP sin fosfato tricálcico como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Reacción de control sin fuente de fósforo, blanco, control abiótico y réplica de MCR24

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un  $\alpha$  del 0.05 y posteriormente una prueba de Tukey (Anexo 2) se determinó el mejor método de conservación relacionada con la preservación de la actividad para cada uno de los aislamientos solubilizadores como se muestra en la tabla 3. En ella se encuentran los diferentes tratamientos evaluados y la concentración de fósforo soluble en ppm de cada aislamiento con una letra (a, b ó c) correspondiente a los grupos formados en la prueba post hoc (Anexo 2). Los resultados del análisis muestran que, para el aislamiento MCR24, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los métodos de conservación evaluados, siendo glicerol (30%) el mejor tratamiento; el aislamiento T3A no presenta diferencias significativas ya que los datos presentaron un comportamiento similar, sin embargo se eligió la media más alta la cual corresponde al tratamiento de liofilización, y el aislamiento T3C, muestra que hay diferencias significativas entre los métodos, donde liofilización y glicerol (30%) son los métodos que tienen mejor efecto en la solubilización de fósforo.

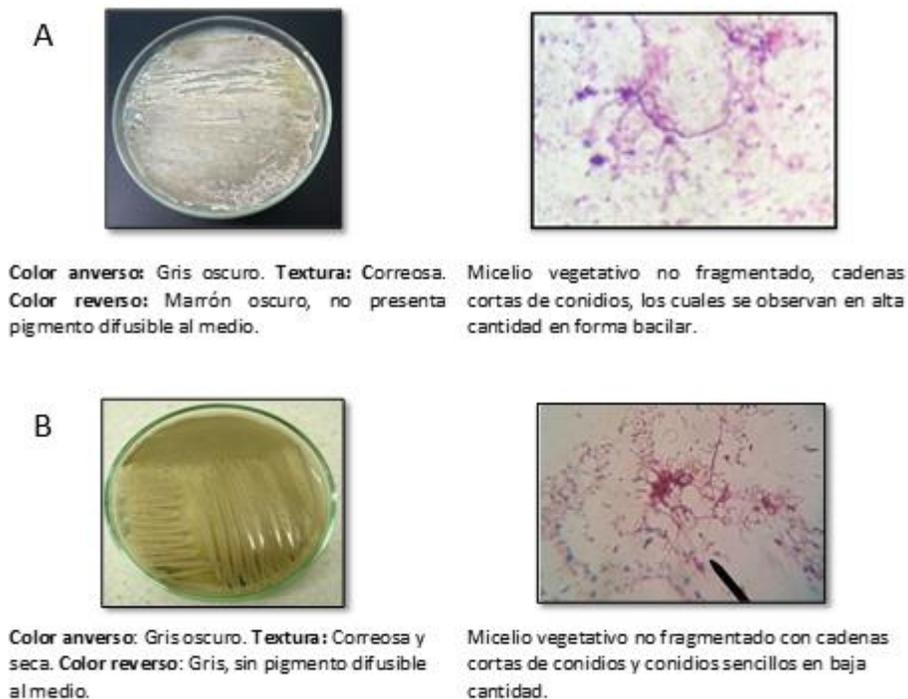
**Tabla 3.** Evaluación de la solubilización de fósforo a partir de los tratamientos\*

Tratamiento	Concentración P soluble (ppm)		
	MCR24	T3A	T3C
Liofilización	22,54 ± 1,826 a	51,36 ± 0,024 a	13,51 ± 0,414 c
Glicerol 20%	20,04 ± 2,056 a	45,26 ± 2,251 a	0,44 ± 0,270 a
Glicerol 30%	43,18 ± 4,742 b	39,02 ± 4,129 a	15,05 ± 0,8 c
Arcilla	26,65 ± 4,612 ab	45,26 ± 2,857 a	6,87 ± 1,438 b
Arena	27,86 ± 5,492 ab	44,63 ± 5,628 a	6,34 ± 1,218 b
Sílica	30,52 ± 2,120 ab	47,29 ± 0,698 a	2,47 ± 0,571 a

\* Los métodos de conservación más efectivos en cuanto a la preservación de actividad para cada aislamiento se presentan en rojo según la agrupación de medias de Tukey.

Promedio de la concentración ± Error estándar

Así mismo se realizó un ANOVA y una prueba de Tukey adicional para confirmar los datos obtenidos en el análisis estadístico general de solubilización de fósforo (Anexo 2).



**Figura 2.** (A) Macroscopía y microscopía del aislamiento T3A al inicio del estudio. (B) Macroscopía y microscopía del aislamiento T3A al final de la evaluación.

Por otra parte se realizaron caracterizaciones morfológicas de cada uno de los aislamientos para evaluar transferencia periódica, en el Anexo 4 se muestran las caracterizaciones correspondientes a la primera fecha de reactivación y a la última fecha evaluada. El aislamiento T3A conserva las características macroscópicas y microscópicas al final del estudio como se muestra en la figura 2, lo que se observó para los demás aislamientos evaluados; sin embargo los resultados de la actividad solubilizadora de fósforo fueron muy bajos para los aislamientos seleccionados con respecto a los valores obtenidos en el estudio realizado por Prada-Salcedo (2013). Este tipo de evaluación es de vital importancia para cepas de actinobacterias que presentan una actividad metabólica de interés, debido a que a algunos de estos microorganismos se les ha detectado que tienden a tener una inestabilidad genética bastante alta, detectada en primera instancia por cambios en la morfología macroscópica.

## 7. DISCUSION DE RESULTADOS

Según los resultados obtenidos en la prueba T para muestras relacionadas entre recuento de células viables con azul de tripán 0,05% en cámara de Neubauer y recuento en placa usando agar Czapek como medio de cultivo, se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos dos métodos de recuento, excepto para sílica y arcilla. El recuento en placa según ICMSF (1999) se define como el recuento de microorganismos viables basado en el número de colonias que crecen en placas de agar con condiciones específicas de crecimiento; el agar que se utilizó para llevar a cabo el procedimiento está compuesto por sacarosa como fuente de carbono y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno; según lo reportado por Ávila (2012) las actinobacterias tienen como requerimientos nutricionales una fuente de carbono orgánica, fuente de nitrógeno inorgánica y sales esenciales, el agar Czapek tiene fosfato dipotásico, sulfato de magnesio y sulfato ferroso, por lo tanto este medio permite el desarrollo adecuado de estos microorganismos, sin embargo las actinobacterias se caracterizan por tener un crecimiento lento aproximadamente de cinco a quince días dependiendo de su fisiología (Becerril 2011), como se pudo observar durante el tiempo de incubación con los aislamientos T3A y L3A, la temperatura puede ser determinante en la velocidad de crecimiento ya que cada microorganismo tiene un rango óptimo de dicho factor que al ser modificado puede generar estrés y retardar su crecimiento, aunque las condiciones fueron las mismas para todos los aislamientos el crecimiento depende de cada uno. La temperatura óptima de crecimiento de las actinobacterias se encuentra en un rango de 25 a 30°C y tarda aproximadamente de cinco a siete días en crecer dependiendo del género; estos microorganismos presentan diferentes tipos de crecimiento, ya sea formando micelio aéreo o micelio de sustrato, con la presencia o ausencia de esporas, que puede incidir en la velocidad de duplicación del microorganismo. Debido a que los aislamientos utilizados no se han identificado en su totalidad, no se puede inferir la tasa de crecimiento, ya que puede variar dependiendo del género de la actinobacteria, por lo tanto sería recomendable realizar un análisis molecular para identificar cada uno de los aislamientos. Por otra parte una manera distinta y evaluada en este estudio para determinar la viabilidad de las células fue mediante el recuento en cámara de Neubauer con azul de tripán, el cual es un colorante azoico que permite diferenciar células vivas de células muertas por exclusión (Coder 1997), las células vivas no permiten el paso del colorante ya que la membrana se encuentra intacta y es selectiva a ciertos compuestos como el azul de tripán, por lo tanto las células muertas se observan de color azul bajo el microscopio. Al ser un colorante con un grupo azo, puede liberar aminas cancerígenas que lo convierte en un colorante intrínsecamente peligroso, por lo tanto las concentraciones deben estar en una relación adecuada que no afecte ni genere toxicidad a la célula durante cierto tiempo, según lo reportado por Coder (1997) a una concentración de 0,4% (p/v) pasados 3 minutos el colorante se vuelve tóxico para la célula, en la figura 3 se observa que los propágulos se tiñen de azul lo que indica que ya no se encuentra viable, sin embargo Cardona (2005) reporta el uso del colorante en una concentración de 0,05% (p/v) dejando

reaccionar durante 5 minutos para poder realizar la lectura, ya que los propágulos excluyen el colorante y se ven transparentes como lo muestra la figura 4.

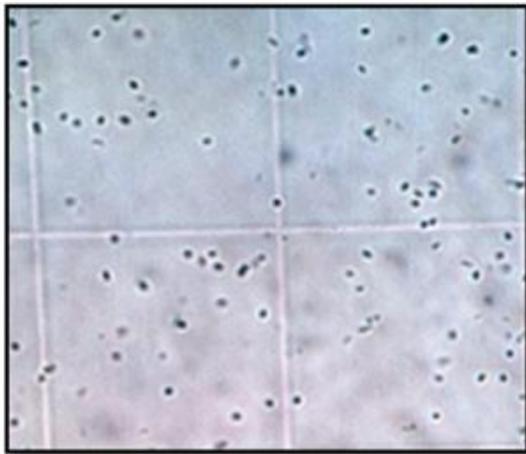
Como no existe diferencia estadísticamente significativa en la mayoría de los métodos según los resultados obtenidos entre recuento en cámara y recuento en placa, se recomienda determinar la concentración de células/ml viables mediante el uso del recuento en cámara de Neubauer tñiendo la muestra con azul de tripán al 0,05% (p/v), debido a que los costos que genera el recuento en placa son más altos y necesitan mayor tiempo para poder generar un resultado, además el recuento de células viables con el uso del colorante se realiza del vial directamente por lo tanto se da un resultado inmediato, mientras que el recuento en placa puede generar resultados con un margen de error más alto ya que el tiempo de incubación y la fisiología del microorganismo pueden afectar el método, sin embargo debe existir una relación constante entre recuento en placa y recuento directo en cámara de Neubauer (Marshall, 1936) tal como se puede observar en la tabla 4 donde se manifiesta dicha relación.

**Tabla 4.** Viabilidad obtenida para recuento en placa y recuento en cámara de Neubauer de los métodos de conservación a mediano plazo.

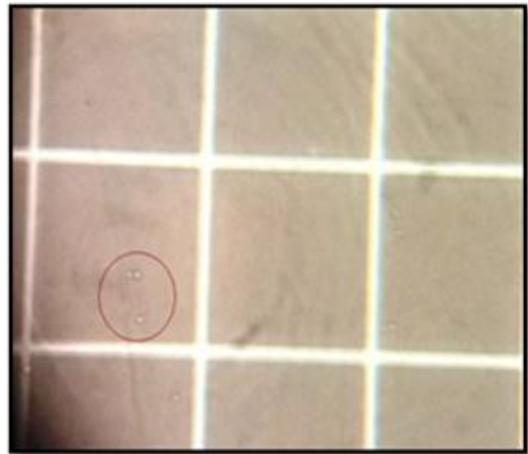
Aislamiento	Inicial	Rcto cámara Arcilla		Inicial	Rcto cámara Sílica		Inicial	Rcto cámara Arena	
		(cel/mL)	(UFC/mL)		(cel/mL)	(UFC/mL)		(cel/mL)	(UFC/mL)
MCR1	3,00E+08	8,00E+07	4,00E+06	1,00E+08	6,00E+07	1,00E+06	1,00E+08	1,00E+08	2,00E+07
MCR9	2,00E+08	5,00E+07	7,00E+06	1,00E+08	5,00E+07	3,00E+06	1,00E+08	1,00E+08	3,00E+07
MCR24	1,00E+08	1,00E+08	1,00E+07	3,00E+07	7,00E+07	1,00E+06	3,00E+07	9,00E+07	2,00E+07
MCR26	4,00E+08	8,00E+07	2,00E+07	4,00E+08	8,00E+07	0,00E+00	4,00E+08	1,00E+08	2,00E+07
L3A	2,00E+08	7,00E+07	3,00E+06	3,00E+08	7,00E+07	1,00E+06	3,00E+08	9,00E+07	2,00E+06
L4B	3,00E+07	1,00E+08	1,00E+07	3,00E+07	4,00E+04	2,00E+06	3,00E+07	9,00E+07	1,00E+06
L4C	2,00E+08	5,00E+07	6,00E+06	2,00E+07	4,00E+07	1,00E+06	2,00E+07	6,00E+07	2,00E+06
M2A	3,00E+08	1,00E+08	2,00E+07	4,00E+08	4,00E+07	1,00E+06	4,00E+08	1,00E+08	1,00E+07
T1B	8,00E+07	3,00E+08	2,00E+07	2,00E+08	6,00E+07	3,00E+06	2,00E+08	5,00E+08	0,00E+00
T1C	4,00E+08	7,00E+07	1,00E+07	2,00E+07	8,00E+07	2,00E+06	2,00E+07	5,00E+08	1,00E+07
T1J	3,00E+08	3,00E+07	2,00E+06	2,00E+07	6,00E+07	2,00E+06	2,00E+07	8,00E+07	2,00E+06
T3A	1,00E+08	1,00E+08	1,00E+09	4,00E+08	6,00E+07	2,00E+06	4,00E+08	2,00E+08	1,00E+07
T3B	2,00E+08	7,00E+07	1,00E+07	2,00E+07	9,00E+07	2,00E+06	2,00E+07	2,00E+08	1,00E+07
T3C	1,00E+08	7,00E+07	7,00E+08	4,00E+08	7,00E+07	2,00E+06	4,00E+08	2,00E+08	2,00E+07
T3D	3,00E+07	4,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	5,00E+07	1,00E+06	2,00E+07	8,00E+07	1,00E+06

En cuanto a la determinación de la viabilidad, esta se presenta de manera constante en la mayoría de los aislamientos por método de conservación, observándose que el recuento en placa disminuye más de dos unidades exponenciales con respecto al inicial. Según lo reportado por Marshall (1936) el recuento en placa es

generalmente más bajo que el recuento directo, puesto que al realizar un recuento en placa es necesario disminuir la carga microbiana mediante un proceso de dilución, aumentando el error experimental; en este estudio se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta  $10^{-8}$  para sembrar las 3 últimas diluciones teniendo en cuenta el recuento en cámara de Neubauer realizado previamente. Existen distintos tipos de error al realizar un recuento en placa, dentro de los cuales se encuentran algunos como: el error involucrado en la preparación de una suspensión diluida (Jennison 1940), la cantidad de alícuota adicionada al medio de cultivo (Snyder 1947), la homogenización de la suspensión de microorganismos y por lo tanto la distribución de los mismos en la alícuota (James 1939), la importancia de estas diferentes fuentes de error dependen considerablemente de las condiciones a las que se llevó a cabo la experimentación, por lo tanto a mayor número de diluciones mayor margen de error según los reportado y los resultados obtenidos, a diferencia del recuento en cámara de Neubauer donde se realizaron menor número de diluciones llegando hasta  $10^{-2}$ .



**Figura 3.** Células muertas teñidas con azul de tripán 0,4% (p/v)



**Figura 4.** Células vivas teñidas con azul de tripán 0,05% (p/v)

Las actinobacterias son microorganismos que tienen la capacidad de conservar características metabólicas luego de someterse a cambios físicos, tal como sucede en el proceso de liofilización, el cual se llevó a cabo para la conservación de los aislamientos, este método consta de un cambio de estado sólido a gaseoso sin pasar por una fase líquida (sublimación) lo que puede afectar la viabilidad celular, como se observa en la tabla 1, el 33.3% de los aislamientos presentaron mejores resultados en cuanto a la viabilidad ya que no disminuyeron más de dos

unidades exponenciales, aunque éste método de conservación ha sido ampliamente reportado (Morgan 2006), el fuerte impacto que reciben las células por el proceso de sublimación disminuye notablemente el porcentaje de viabilidad de los microorganismos según Bozoglú et al. (1987); sin embargo, se observa que al cabo de un año de evaluación ningún aislamiento presentó descenso en mas de dos unidades exponenciales, lo que permite comprobar que es un método viable para la conservación de dichos microorganismos; por otra parte la criopreservación es uno de los métodos más reportados junto con liofilización, ya que han sido estandarizados para la preservación celular; sin embargo, no hay reportes que indiquen las características óptimas de conservación para actinobacterias, por lo tanto según lo reportado por Hubalek (2003) la criopreservación se puede llevar a cabo a bajas temperaturas con concentraciones de criopreservante específicas, como se puede observar en la tabla 1, el 33,3% de los aislamientos tanto para glicerol al 20% (v/v) como glicerol 30% (v/v) presentaron un buen resultado de viabilidad, el cual se mantuvo sin descender más de dos unidades exponenciales, aun así el aislamiento M2A presentó un descenso significativo en glicerol 30% (v/v), según lo reportado por Rojas (2013) se corrobora que la viabilidad de los aislamientos disminuye significativamente durante el tiempo de evaluación a bajas temperaturas de almacenamiento.

Fonseca (2006) reporta en su estudio que el descenso de la viabilidad se puede presentar debido a que a bajas velocidades de congelación se causa un mayor daño a las células por estrés osmótico y a la formación de cristales amorfos (Pegg, 2002), a diferencia de los cristales que se forman a altas velocidades de congelación los cuales no causan un daño directo a la célula, sin embargo Morris (2006) propuso un mecanismo alternativo de daño celular el cual consiste en el desequilibrio osmótico que presenta la célula durante la descongelación y por lo tanto el descenso en la viabilidad se puede generar por alguna o todas las propuestas mencionadas anteriormente, sin embargo estos reportes han sido descritos para bacterias no filamentosas y contrastando con los resultados de este estudio según la Tabla 1 no se confirma lo propuesto por Morris (2006).

Las actinobacterias son microorganismos presentes en diversos ambientes y se encuentran en una proporción de 20-60% de la población microbiana del suelo (Franco-Correa 2008) siendo un porcentaje representativo en este hábitat, por lo tanto los métodos de conservación a mediano plazo se llevaron a cabo en 2 diferentes matrices que hacen parte del suelo, como son la arcilla y la arena, aunque la sílica gel ha sido reportado como método de conservación es un material sintético fabricado a partir de silicato sódico que proviene de compuestos como el cemento.

Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico de varianzas y la prueba de Tukey muestran que el método de conservación en sílica gel no fue efectivo para ningún aislamiento, esto se puede deber a que la sílica es un compuesto desecante, es decir que elimina la humedad del ambiente en el que se encuentre, lo cual puede afectar la viabilidad del microorganismo ya que se reduce drásticamente el metabolismo y algunos géneros no sobreviven

a este proceso, por lo tanto es necesario añadir agentes protectantes como la leche descremada al 10% según lo reportado por Cody et al. (2008).

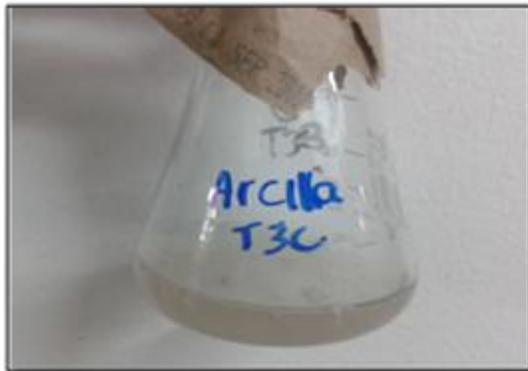
La textura del suelo se define como el porcentaje en peso de cada fracción mineral, arena, limo y arcilla. La arena se clasifica según su tamaño en arena muy gruesa, gruesa, media, fina y muy fina. La arena fina, utilizada en este estudio, tiene un tamaño de 0,10 a 0,25 mm (Hodgson 1987) y la proporción de estas partículas determina la retención de agua, la estructura del suelo y la disponibilidad de aire y nutrientes (Glyan 1999), el resultado que arrojó el análisis estadístico muestra que el 73% de los aislamientos obtuvieron mayor afinidad con el método de conservación en arena lo cual ratifica lo mencionado anteriormente, además la arena se usa en distintos procesos como la filtración de aguas lo cual indica la capacidad de la arena para retener los microorganismos manteniéndolos viables, por otra parte el 27% de los aislamientos presentaron estabilidad al relacionarlo con la viabilidad, no disminuyendo más de dos unidades exponenciales en el método de conservación utilizando arcilla como matriz. La arcilla es un grano muy fino compuesto principalmente por silicatos, este estudio se llevó a cabo haciendo uso de arcilla artesanal; es decir, una arcilla que ha pasado por un proceso térmico, por lo tanto ha perdido propiedades físicas, los suelos que presentan alto contenido de arcilla tienen alta capacidad de retención de agua pero escasa aireación lo cual se ve ligado al tamaño del poro debido a que las partículas se encuentran en un rango inferior a 0,002 mm, aunque no existen reportes que especifiquen acerca del uso de arcilla como método de conservación en actinobacterias, al cabo del estudio se demostró que la viabilidad se mantuvo sin disminuir más de un exponente en comparación con los demás métodos evaluados.

La transferencia periódica es un método común de conservación que consiste en pases periódicos del microorganismo a medios de cultivo específicos, sin embargo diferentes estudios han demostrado el efecto del medio sobre algunas características de los microorganismos (García 2006). Para efectos de este estudio el medio de cultivo empleado fue agar avena (15 g/L) (Anexo 3) reportado por Franco-Correa (2008) ya que permite la esporulación de las actinobacterias. Como se puede observar en el anexo 4, los aislamientos seleccionados para la cuantificación de fósforo presentan las mismas características morfológicas al inicio y al final de la evaluación, sin embargo las concentraciones de fósforo soluble obtenidas en este método de conservación fueron bajas teniendo como referencia las concentraciones reportadas por Prada-Salcedo (2013), aunque se debe tener en cuenta que la cuantificación en dicho estudio se realizó a partir de aislamientos primarios, es decir, con no más de 2 pases sucesivos; en cambio, en este estudio se evaluó la solubilización después de cuatro transferencias en agar avena. Se ha demostrado que existe una tendencia de los microorganismos a perder su capacidad de esporulación, de crecimiento y producción o expresión de enzimas, lo cual corrobora los resultados obtenidos en el presente estudio; Lezama (1994) demostró que los pases sucesivos sobre los medios causan pérdida gradual de las características metabólicas de los microorganismos, debido a los distintos componentes del medio, y otros

factores como el pH, la temperatura y la humedad relativa; por lo tanto transferencia periódica no es un método aconsejable para actinobacterias solubilizadoras de fósforo independientemente que disminuya costos en el laboratorio, pues presenta alto riesgo de contaminación lo que incrementa el tiempo de investigación y no es fácil de transportar y/o manejar, siendo éste un factor relevante en la elección de un método de conservación.

Los tres aislamientos seleccionados para realizar la cuantificación de la actividad solubilizadora de fósforo se tomaron a partir de resultados obtenidos por Prada-Salcedo (2013) y la cuantificación se realizó en base a la metodología propuesta por Mehta y Nautiyal (2001) en medio líquido NBRIP, diversos autores han reportado que el mecanismo de solubilización de fósforo inorgánico insoluble se da por la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glucónico y ceto-glucónico (Rodriguez y Fraga 1999; Deubel et al. 2000; Bobadilla 2008; Leyval y Barthelin 1989), sin embargo en este estudio no se realizó una prueba que determinara cualitativamente la producción de ácidos, para ello se puede utilizar el medio líquido NBRIP suplementado con azul de bromofenol (Anexo 3) y es recomendable como prueba confirmatoria.

Se observa que el control de medio NBRIP sin fuente de fósforo inorgánico presenta coloración azul (Figura 1) lo que indica que el medio de cultivo tiene un componente que interfiere con la técnica, por lo tanto el control abiótico se realizó para determinar la concentración total de fósforo presente en el medio (5,32 ppm) y de esta forma restársela a las concentraciones obtenidas para los aislamientos. La figura 5 muestra que la solubilización del fósforo insoluble fue baja, lo que se confirma con el resultado de concentración que fue de 6,47 ppm; a diferencia de la figura 6 presenta la cual presenta el aislamiento T3A en el mismo método de conservación con una concentración de fósforo soluble de 45,26 ppm. Cuando el fósforo se solubiliza el medio cambia de color blanco a transparente con alta cantidad de biomasa lo que indica que el microorganismo tomó el fósforo y lo inmovilizó, por lo tanto se puede inferir que a mayor biomasa mayor solubilización, sin embargo la concentración de fósforo soluble para este aislamiento es baja respecto a lo reportado por Prada-Salcedo (2013) dónde se obtuvieron concentraciones de 520 ppm aproximadamente, esto se debe a que las actinobacterias evaluadas vienen de un proceso físico de alto impacto para el microorganismo, el cual puede generar un descenso considerable de la actividad, por ello se recomienda realizar la metodología propuesta por Prada-Salcedo (2013) para obtener concentraciones similares.



**Figura 5.** Solubilización de fósforo del aislamiento T3C en Arcilla



**Figura 6.** Solubilización de fósforo del aislamiento T3A en Arcilla

El método 1.14848 Spectroquant de Merck® es análogo a la norma internacional ISO 6878/1-2005 (Valcan 2011), la cual se emplea para la determinación de ortofosfatos y fósforo total en aguas y suelo. La curva patrón de fósforo que se obtuvo a una longitud de onda de 880 nm fue similar a la reportada por Valcan (2011), confirmando los resultados del presente estudio, de tal manera que para investigaciones posteriores se puede realizar una estandarización de la técnica para intereses del laboratorio evaluando diferentes parámetros y comparándolos con el inserto del Kit Spectroquant de Merck®, teniendo en cuenta parámetros operativos estadísticos como reproducibilidad y reproducibilidad, incertidumbre y porcentaje de error.

La importancia de este trabajo radica en que no existen reportes de conservación para actinobacterias que presenten actividad solubilizadora de fósforo, según el análisis estadístico los métodos evaluados a largo plazo resultaron ser los mejores en cuanto a la preservación de características genotípicas, según lo reportado por García (2001) la elección de estos métodos garantiza la estabilidad genética ya que evita la aparición de generaciones sucesivas, sin embargo es indispensable elegir varios métodos de conservación que conjuntamente permitan mantener el material biológico de interés, minimizando la posibilidad de pérdida de las características del microorganismo, ya sea por el descenso en la viabilidad, cambios en las condiciones de almacenamiento o presencia de contaminación, ya que todo método válido no es absolutamente perfecto donde los mismos mecanismos que producen efectos favorables no pueden evitar ocasionar daños colaterales según lo reportado por Parra (2006) y Rico (2004). En la tabla 4 se observa en color rojo los métodos de largo plazo seleccionados; liofilización y glicerol 30%, sin embargo estos métodos no son generales para todos los aislamientos seleccionados, exceptuando T3C, ya que el análisis determinó que existen diferencias entre liofilización y glicerol 30% por lo cual se seleccionó el método de liofilización debido a que también preserva la viabilidad celular. La tabla 1 muestra

que la liofilización mantuvo la viabilidad del aislamiento MCR24, sin embargo en el método de glicerol 30% la viabilidad no disminuyó más de dos unidades exponenciales, por esta razón se elige dicho tratamiento debido que la actividad solubilizadora de fósforo es el factor primordial de este estudio. De otro modo el método de liofilización fue más efectivo para el aislamiento T3A ya que mantuvo la viabilidad y la actividad. Existen varios estudios donde se recomienda la liofilización como método de elección por su comodidad para el almacenamiento y/o transporte ya que pueden almacenarse a temperatura ambiente lo cual facilita su manejo y envío (Fisher et al. 1982; Singh et al. 2004; Estrada y Vélez 2006), por otro lado la conservación de los microorganismos a altas temperaturas de almacenamiento como es el caso de  $-80^{\circ}\text{C}$  genera una congelación rápida, lo cual impide la formación de cristales amorfos que puedan afectar los microorganismos, según lo reportado por Sánchez (2005) en estos métodos de conservación se induce una adaptación bacteriana donde la reducción en la velocidad metabólica es significativa pero a su vez es suficiente para mantener al microorganismo viable, algunas de las adaptaciones son: producción de enzimas resistentes al frío, sistemas de transporte adaptados a bajas temperaturas, aumento de la concentración de ácidos grasos en la cadena de fosfolípidos de la membrana lo cual permite que continúe el estado semifluido y evitar la congelación.

A partir del análisis de costos (Anexo 6), se determinó el valor total de cada uno de los métodos de conservación, siendo la liofilización quien presentó el monto más alto con \$59,720.645 y arcilla el más bajo con \$29.735.362; la realización del proyecto generó un costo total de \$90.622.316 el cual fue financiado dentro de recursos propios obtenidos a través de proyectos financiados por la vicerrectoría académica de la Pontificia Universidad Javeriana.

Para el desarrollo del proyecto se tuvieron en cuenta 3 factores primordiales, la viabilidad, la actividad solubilizadora de fósforo y los costos (Tabla 5) a partir de éstos se puede sugerir un método de conservación apropiado para dichos microorganismos (actinobacterias), sin embargo en el presente estudio se objetó encontrar el mejor método de conservación para cada uno de los aislamientos, teniendo en cuenta la actividad solubilizadora de fósforo como parámetro determinativo.

**Tabla 5.** Viabilidad, concentración de fósforo soluble y costos de los tratamientos evaluados\*

Plazos	Tratamiento	Viabilidad (células /mL)	Actividad solubilizadora de fósforo (ppm)	Costos (COP)
Largo	Liofilización	9,00E+07	29.13	59.750.766
	Glicerol 20%	1,00E+08	21.91	39.237.471
	Glicerol 30%	8,00E+07	32.42	46.254.094
Mediano	Arena	1,00E+08	26.28	32.287.432
	Arcilla	8,00E+07	26.26	29.735.362
	Silica Gel	5,00E+07	26.76	32.382.529
Corto	T. Periódica	Cualitativo	23.23	32.215.099

\*Los cuadros rojos respresentan los tratamientos seleccionados en cuanto a la mejor viabilidad, la concentración mas alta de fósforo soluble y los costos mas bajos.

En la Tabla 5 se observan algunos valores resaltados en color rojo, los cuales indican en la viabilidad y en la actividad solubilizadora de fósforo, los datos más altos y en cuanto a costos, los más bajos. El método de glicerol al 20% correspondiente a largo plazo y arcilla de mediano plazo, fueron los métodos más económicos de cada uno de los tiempos evaluados, aunque no presentaron los mejores resultados de viabilidad y actividad solubilizadora, la concentración de fósforo soluble no disminuyó más del 32%, lo que permite inferir que los métodos evaluados son eficaces y su elección se debe realizar según el interés que se tenga al momento de llevar a cabo la conservación.

## **8. Conclusiones**

- Se determinó el mejor método de conservación para cada uno de los aislamientos evaluados en el estudio.
- La viabilidad y la pureza de cada uno de los aislamientos evaluados se mantuvieron estables a través del tiempo de estudio.
- Se mantuvo la actividad solubilizadora de fosforo al cabo de un año de evaluación en los métodos de conservación evaluados.

## **RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS**

Para la conservación de los aislamientos solubilizadores de fósforo presentados en este estudio se recomienda el método de glicerol 30% a una temperatura de almacenamiento de -80°C aunque el método de liofilización también es válido.

Para estudios posteriores se recomienda la identificación molecular de la totalidad de los aislamientos para saber hasta nivel de especie que microorganismo se tiene y determinar para cada uno el método de conservación más viable, en cuanto a costos y solubilización.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Ávila I (2012) Diseño de medios de cultivo para la producción de actinobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Colombia.
- Bashan Y, Gonzalez LE (1999) Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51 (2):262-267.
- Bautista H, Valdés M (2008) *Frankia* y la simbiosis actinorrízica. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50(3): 90-102.
- Balagurunathan R, Subramanian A (1993) Estudios sobre *Streptomyces nigrifaciens* (P-9) marino. Taxonomía y estandarización de producción de antibiótico. *Ciencias Marinas* 19(4): 435-443.
- Becerril A (2011) Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: Diversidad, Bioactividad y Dominios Cetosintetasa. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, México.
- Bobadilla C, Rincón S (2008) Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Págs. 79.
- Bozoglú TF, Ozilgen M, Bakir U (1987) Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microbiology Technology* 9: 531–537.
- Brahmadathan KN et al. (1998) Preservation of *Streptococcus pneumoniae* by sand desiccation. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 16:179-180.
- Burguet N, Sierra N, Brito L. (2012) Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en laboratorios Liorad. *Cenic Ciencias Biológicas*. 43(3).
- Cardona G, Arcos A, Murcia U (2005) Abundancia de actinomicetes y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonía colombiana. *Agronomía Colombiana*. 23(2):317-326.
- Carrillo A, Puente M, Castellanos T, Bashan Y (1998) Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. Manual de laboratorio. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

Chen H, Chin W, Chen M (2006) The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in Kefir. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(1): 126-130.

Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA & Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-4. En: Prada-Salcedo, L (2013) Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes Orientales Colombianos. Tesis de Maestría en Microbiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (IBUN). págs. 1

Chitiva L, Dussán J (2003) Evolución de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas* spp en biorremediación del fenol. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 2: 5-10.

Chuang C, Kuo Y, Chao W (2006) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils.* 43(5): 575-584.

Coder DM (1997) Assessment of cell viability. *Current protocols in Cytometry.*

Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, Hagman KE, Ott CM, Nickerson CA, Schurr MJ (2008) Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *Journal Microbiology Methods.* 75(1): 135-138.

Coyne M (2009) Microbiología del suelo: un enfoque explorativo. Edición Paraninfo. Madrid. España. Págs. 178-182.

Collavino M, Sansberro P, Mroginski L, Aguilar O (2010) Comparision of in vitro solubilization activity of diverse phosphate solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils.* 46(7): 727-738.

Deubel A, Gransee A, Merbach W (2000) Tranformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 163: 387-392.

Estrada MN, Vélez PE (2003). Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. Manejo integrado de plagas y agroecología, Costa Rica (70): 97-103.

EPA. (1971) Procedimiento de la EPA 365.2: Phosphorous, All forms (colorimetric, ascorbic acid, single reagent). Approved for NPDES. (EPA/600/4-79/020).

Fisher N, Burgess W, Toussoun TA, Nelson PE (1982). Carnation Leaves as a Substrate and for Preserving Cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 72: 151-153.

Fonseca F, Marin M, Morris GJ (2006) Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology* 72(10): 6474-6482.

Font de Valdez G, G De Giori A, P de Ruiz Holgado and G. Oliver (1983) Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:302-304. En: Chen H, Chin W, Chen M. (2006). The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in Kefir. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(1): 126-130.

Franco-Correa M (2008) Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. España.

Franco-Correa M (2009) Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista peruana de biología*, 16(2), 239-242.

Freire J, Sato M (1999) Conservación de Cultivos de Rizobios. *Revista latinoamericana de microbiología-mexico*, 41(1), 35-42.

García M, Uruburu F (2001) La conservación de cepas microbianas. Colección Microbiana de Cultivos Tipo (CECT) Universidad de Valencia, España. Temas de la actualidad. Archivo pdf disponible en: <http://www.uv.es/cect>. Consultado el 13 de Marzo de 2012.

García MX, Villamizar LF, Torres LA, Cotes AM (2006) Efecto de subcultivos sucesivos de *Beauveria bassiana* sobre sus características y actividad contra *Premnotrypes vorax*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. CORPOICA. Centro de Biotecnología y Bioindustrias. 77: 50-56.

Glyan HJ, Gary H (1999) *Ingeniería Ambiental*. 2ª edición. Editorial Prentice Hall. México. 271-273.

Grivell AR, Jackson JF (1969) Microbial culture preservation with silica gel. *Journal of General Microbiology* 58:423-425.

Hancocks NH, Thomas CR, Stocks SM, Hewitt CJ (2010) An investigation into the preservation of microbial cell banks for [alpha]-amylase production during 5 l fed-batch *Bacillus licheniformis* fermentations. *Biotechnol Lett*; 32(10):1405-12.

Heckly R (1978) Preservation of micro-organisms. *Adv. Appl. Microb.* 3, 1-76. En: Perry, S. F. (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9(1), 59-64.

Hodgson JM (1987) Muestreo y descripción de suelos. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España. 55-57.

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies (1999) Microorganismos de los alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

James N, Sutherland M (1939) The accuracy of the plating method for estimating the numbers of soil bacteria, actinomyces, and fungi in the dilution plated. *Canadian Journal Research* (17): 72-86.

Jennison, Marshall W, Wadsworth GP (1940) Evaluation of the errors involved in estimating bacterial numbers by the plating method. *Journal of Bacteriology*. (39): 389-397.

Koshi G et al. (1977) Preservation of streptococci and other bacteria by sand desiccation and filter paper techniques. *Indian Journal of Medical Research*. 65: 500-502.

Lezama R (1994) Patogenicidad de hongos parásitos de insectos. Primer Seminario de Patología. FCBA. Colombia, Universidad de Colima. 47-82.

Leyval C, Barthelin J (1989) Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil*. 17: 103-110.

Macas D, Paccha M (2012) Aislamiento de metabolitos bioactivos de procesos fermentativos de actinobacterias recolectadas en ecosistemas marinos. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. En: Sylvia D (2005) Principles and applications of soil microbiology, Pearson /Prentice Hall, Segunda Edición: New Jersey, 259-306.

Marshall WJ (1936) Relations between plate counts and direct microscopic counts of *Escherichia coli* during the logarithmic growth period. Departamento de Biología y Salud Pública, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts (89): 461-477.

- Martínez M, Pedroza A, Gutiérrez V (2010) Métodos microbiológicos, físicos y químicos con aplicación ambiental. Primera edición. Editorial USM. Santiago de Chile. Chile. Págs. 31-33.
- Matiz A, Torres C, Poutou R (2002) Producción de etanol con células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* spp. MVZ-CORDOBA. 7: 216-233.
- Mehta S & Nautiyal CS (2001) An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Current Microbiology* 43: 51-56.
- Morris GJ, Goodrich M, Acton E, Fonseca F (2006) The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: Effects on cryopreservation. *Cryobiology* 52: 323-334.
- Nakasone K, Peterson S, Shung-Shang J (2004) Preservation and distribution of fungal cultures. Capítulo 3. 37-47. En: Mueller G, Foster M. (2004). Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. China.
- Navarro M, Sossa D (2003) Obtención de etanol a partir de Almidón de papa proveniente del sector agrícola. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 71-124.
- Oviedo M, Iglesias M (2005). Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás. Resumen: A-053. Cátedra de Microbiología Agrícola – Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. Págs 1.
- Parra S, Pérez M, Bernal M, Suarez Z, Montoya D (2006) Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Nova – Publicación científica. 4(5): 39 – 49 pp.
- Pérez E, Sulbarán M, Ball MM & Yarzabal LA (2007) Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south- eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2905-2914.
- Perkins D (1962) Preservation of *Neurospora* stock cultures in anhydrous silica gel. *Canadian Journal of Microbiology*. Canada. 8: 591-594.
- Perry SF (1998) Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9(1), 59-64.

Prada-Salcedo LD. (2013). Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes Orientales Colombianos. Tesis de Maestría en Microbiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (IBUN). págs. 1

Rico M, Piattoni CV, González C, Monela R, Latoree MG (2004) Variabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Revista Fabicib*. 8: 163-172.

Rodríguez D, Gato Y (2010) Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*. 14(4): 241-246.

Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.

Sánchez J, Valencia H, Valero NO (2005) Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizosfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del páramo El Granizo. *Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera Oriental de Colombia*. Capítulo 11. Primera Edición. Págs. 177.

Sánchez LC, Corrales LC (2005) Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. NOVA Publicación científica. 3: 109-110.

Siberry G et al. (2001) Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bulletin of the World Health Organization*. 79(1): 43-47

Sieverding E (1983) Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo arbuscular en el laboratorio. Centro de Investigaciones en Agricultura Tropical (CIAT), Palmira (Colombia). En: Cardona G, Arcos A, Murcia U (2005) Abundancia de actinomicetos y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana. *Agronomía Colombiana* 23(2): 317-326.

Singh SK, Upadhyay RC, Yadav MC, Tiwari M (2004). Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current science*. 87 (5): 568-570.

Snyder TL (1947) The relative errors of bacteriological plate counting methods. Camp Detrick, Frederick, Maryland. (54): 641- 654.

Sundara B, Natarajan V, Hari K (2002) Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field crops research* 77: 43-49. En: Prada-Salcedo L (2013)

Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes Orientales Colombianos. Tesis de Maestría en Microbiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (IBUN). págs. 1

Thompson LM, Troeh FR (1988) Los suelos y su fertilidad. Cuarta edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España.

Vera D, Pérez H, Valencia H (2002) Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana*. 7(1), 33-40. En: Tarafdar J, Rao A (1996) Contribution of *Aspergillus* strains to acquisition of phosphorus by wheat (*Triticum aestivum* L.) and chick pea (*Cicer arietinum* Linn.) grown in a loamy sand soil. *Applied Soil Ecology*, 3: 109-114.

Vera D, Pérez H, Valencia H (2002) Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana*. 7(1), 33-40. En: Fennell D, Kenneth B (1977) The genus *Aspergillus*. *Robert E. Krieger Publishing Co.*, New York, USA. Págs 686.

Xiao CQ, Chi RA, Huang XH, Zhang WX, Qiu GZ & Wang DZ (2008) Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering* 33: 187-193. En: Prada-Salcedo L. (2013) Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes Orientales Colombianos. Tesis de Maestría en Microbiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (IBUN). págs. 1.

Zahir A, Arshad M, Frankenberg W (2004) Plant Growth Promoting Rhizobacteria; Application and Perspectives in Agricultura. *Advances in Agronomy*. 81:97-108. En: Franco-Correa M (2008) Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. España.

## ANEXO 1

### Prueba T para muestras relacionadas

#### Liofilización

##### Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas		T	Gl	Sig. (bilateral)
	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
	Inferior	Superior			
Par 1 Recuento en cámara – Recuento en placa	-3,30409E9	3,01427E8	-1,786	14	,096

#### Glicerol 20%

##### Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas		T	Gl	Sig. (bilateral)
	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
	Inferior	Superior			
Par 1 Recuento en cámara – Recuento en placa	-3,08378E8	56244943,9060 9	-1,483	14	,160

Glicerol 30%

**Prueba de muestras relacionadas**

		Diferencias relacionadas		t	Gl	Sig. (bilateral)
		95% Intervalo de confianza para la diferencia				
		Inferior	Superior			
Par 1	Recuento en cámara – Recuento en placa	-3,69902E8	67098127,3155 9	-1,486	14	,159

Arcilla

**Prueba de muestras relacionadas**

		Diferencias relacionadas		t	Gl	Sig. (bilateral)
		95% Intervalo de confianza para la diferencia				
		Inferior	Superior			
Par 1	camara - placa	-2,05193E8	1,34259E8	-,448	14	,661

Arena

**Prueba de muestras relacionadas**

	Diferencias relacionadas		t	Gl	Sig. (bilateral)
	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
	Inferior	Superior			
Par 1 camara - placa	75188023,4374 6	2,35745E8	4,154	14	,001

Sílica gel

**Prueba de muestras relacionadas**

	Diferencias relacionadas		t	Gl	Sig. (bilateral)
	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
	Inferior	Superior			
Par 1 camara - placa	45014282,4234 8	69124384,2431 9	10,154	14	,000

## ANEXO 2

### Análisis estadístico

ANOVA de un factor para métodos a largo plazo

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
MCR1	Inter-grupos	2,629E16	2	1,314E16	11,267	,009
	Intra-grupos	7,000E15	6	1,167E15		
	Total	3,329E16	8			
MCR9	Inter-grupos	1,238E17	2	6,191E16	55,700	,000
	Intra-grupos	6,669E15	6	1,111E15		
	Total	1,305E17	8			
MCR24	Inter-grupos	6,022E15	2	3,011E15	2,631	,151
	Intra-grupos	6,867E15	6	1,144E15		
	Total	1,289E16	8			
MCR26	Inter-grupos	7,869E16	2	3,934E16	354,100	,000
	Intra-grupos	6,667E14	6	1,111E14		
	Total	7,936E16	8			
L3A	Inter-grupos	5,578E16	2	2,789E16	2345,832	,000
	Intra-grupos	7,133E13	6	1,189E13		
	Total	5,585E16	8			
L4B	Inter-grupos	1,627E16	2	8,133E15	180,852	,000
	Intra-grupos	2,698E14	6	4,497E13		
	Total	1,654E16	8			
L4C	Inter-grupos	8,682E16	2	4,341E16	57,456	,000
	Intra-grupos	4,533E15	6	7,556E14		
	Total	9,136E16	8			
M2A	Inter-grupos	3,440E15	2	1,720E15	7,026	,027
	Intra-grupos	1,469E15	6	2,448E14		
	Total	4,909E15	8			

T1B	Inter-grupos	8,667E14	2	4,333E14	1,950	,223
	Intra-grupos	1,333E15	6	2,222E14		
	Total	2,200E15	8			
T1C	Inter-grupos	1,422E15	2	7,111E14	5,224	,049
	Intra-grupos	8,167E14	6	1,361E14		
	Total	2,239E15	8			
T1J	Inter-grupos	5,830E16	2	2,915E16	372,269	,000
	Intra-grupos	4,698E14	6	7,831E13		
	Total	5,877E16	8			
T3A	Inter-grupos	1,601E16	2	8,003E15	7,149	,026
	Intra-grupos	6,717E15	6	1,119E15		
	Total	2,272E16	8			
T3B	Inter-grupos	1,349E16	2	6,744E15	5,518	,044
	Intra-grupos	7,333E15	6	1,222E15		
	Total	2,082E16	8			
T3C	Inter-grupos	7,389E14	2	3,694E14	3,800	,086
	Intra-grupos	5,833E14	6	9,722E13		
	Total	1,322E15	8			
T3D	Inter-grupos	2,022E15	2	1,011E15	8,878	,016
	Intra-grupos	6,833E14	6	1,139E14		
	Total	2,706E15	8			

Tukey

**MCR1**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		A	B
glicerol 20	3	4,333E7	
liofilizacion	3	6,333E7	
glicerol 30	3		1,667E8
Sig.		,763	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

**MCR9**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		A	B	C
glicerol 30	3	1,400E7		
liofilizacion	3		1,333E8	
glicerol 20	3			3,000E8
Sig.		1,000	1,000	1,000

**MCR24**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		A
glicerol 30	3	7,000E7
liofilizacion	3	1,000E8
glicerol 20	3	1,333E8
Sig.		,133

**MCR26**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		A	B
liofilizacion	3	9,000E7	
glicerol 20	3	9,333E7	
glicerol 30	3		2,900E8
Sig.		,922	1,000

**L3A**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		A	B	C
glicerol 30	3	7,3333E6		
liofilizacion	3		9,6667E7	
glicerol 20	3			2,0000E8
Sig.		1,000	1,000	1,000

**L4B**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		A	B
glicerol 30	3	6,6667E6	
liofilizacion	3		9,3333E7
glicerol 20	3		1,0000E8
Sig.		1,000	,486

**L4C**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		A	B
glicerol 20	3	9,6667E7	
liofilizacion	3	1,0000E8	
glicerol 30	3		3,0667E8
Sig.		,988	1,000

**M2A**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		A	B
glicerol 30	3	6,8333E6	
liofilizacion	3	4,0000E7	4,0000E7
glicerol 20	3		5,3333E7
Sig.		,090	,579

**T1B**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		A
glicerol 30	3	7,6667E7
liofilizacion	3	9,3333E7
glicerol 20	3	1,0000E8
Sig.		,214

**T1C**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		A
glicerol 30	3	7,3333E7
liofilizacion	3	1,0000E8
glicerol 20	3	1,0000E8
Sig.		,070

**T1J**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		A	B	C
glicerol 30	3	5,8333E6		
glicerol 20	3		7,3333E7	
liofilizacion	3			2,0000E8
Sig.		1,000	1,000	1,000

**T3A**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		A	B
glicerol 30	3	6,5000E7	
glicerol 20	3	1,0000E8	1,0000E8
liofilización	3		1,6667E8
Sig.		,455	,110

**T3B**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		A
glicerol 20	3	8,0000E7
glicerol 30	3	1,5667E8
liofilizacion	3	1,6667E8
Sig.		,052

**T3C**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		A
glicerol 30	3	7,8333E7
glicerol 20	3	9,3333E7
liofilizacion	3	1,0000E8
Sig.		,080

**T3D**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
glicerol 30	3	6,6667E7	
glicerol 20	3		9,6667E7
liofilizacion	3		1,0000E8
Sig.		1,000	,923

## ANOVA de un factor para métodos a mediano plazo

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
MCR1	Inter-grupos	1,689E15	2	8,444E14	9,500	,014
	Intra-grupos	5,333E14	6	8,889E13		
	Total	2,222E15	8			
MCR9	Inter-grupos	4,356E15	2	2,178E15	39,200	,000
	Intra-grupos	3,333E14	6	5,556E13		
	Total	4,689E15	8			
MCR24	Inter-grupos	4,622E15	2	2,311E15	2,000	,216
	Intra-grupos	6,933E15	6	1,156E15		
	Total	1,156E16	8			
MCR26	Inter-grupos	6,889E14	2	3,444E14	1,938	,224
	Intra-grupos	1,067E15	6	1,778E14		
	Total	1,756E15	8			
L3A	Inter-grupos	1,089E155	2	5,444E154	1,000	,422
	Intra-grupos	3,267E155	6	5,444E154		
	Total	4,356E155	8			
L4B	Inter-grupos	2,196E16	2	1,098E16	2,440	,168
	Intra-grupos	2,700E16	6	4,500E15		
	Total	4,896E16	8			
L4C	Inter-grupos	4,222E14	2	2,111E14	2,111	,202
	Intra-grupos	6,000E14	6	1,000E14		
	Total	1,022E15	8			

M2A	Inter-grupos	5,689E15	2	2,844E15	256,000	,000
	Intra-grupos	6,667E13	6	1,111E13		
	Total	5,756E15	8			
T1B	Inter-grupos	4,188E17	2	2,094E17	46,644	,000
	Intra-grupos	2,693E16	6	4,489E15		
	Total	4,457E17	8			
T1C	Inter-grupos	3,473E17	2	1,736E17	17,230	,003
	Intra-grupos	6,047E16	6	1,008E16		
	Total	4,078E17	8			
T1J	Inter-grupos	3,289E15	2	1,644E15	4,000	,079
	Intra-grupos	2,467E15	6	4,111E14		
	Total	5,756E15	8			
T3A	Inter-grupos	4,942E16	2	2,471E16	22,240	,002
	Intra-grupos	6,667E15	6	1,111E15		
	Total	5,609E16	8			
T3B	Inter-grupos	4,682E16	2	2,341E16	20,260	,002
	Intra-grupos	6,933E15	6	1,156E15		
	Total	5,376E16	8			
T3C	Inter-grupos	7,482E16	2	3,741E16	25,127	,001
	Intra-grupos	8,933E15	6	1,489E15		
	Total	8,376E16	8			
T3D	Inter-grupos	2,956E15	2	1,478E15	5,542	,043
	Intra-grupos	1,600E15	6	2,667E14		
	Total	4,556E15	8			

## Tukey

### MCR1

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Silica	3	6,667E7	
Arcilla	3	8,667E7	8,667E7
Arena	3		1,000E8
Sig.		,090	,269

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

### MCR9

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Arcilla	3	5,3333E7	
Silica	3	5,3333E7	
Arena	3		1,0000E8
Sig.		1,000	1,000

### MCR24

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Silica	3	8,0000E7
Arena	3	9,3333E7
Arcilla	3	1,3333E8
Sig.		,213

**MCR26**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Arcilla	3	8,0000E7
Silica	3	8,3333E7
Arena	3	1,0000E8
Sig.		,237

**L3A**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Arcilla	3	7,0000E7
Arena	3	9,3333E7
Silica	3	2,3333E77
Sig.		,483

**L4B**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Silica	3	4,6667E7
Arena	3	9,3333E7
Arcilla	3	1,6667E8
Sig.		,151

**L4C**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Silica	3	4,6667E7
Arcilla	3	5,6667E7
Arena	3	6,3333E7
Sig.		,183

**M2A**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Silica	3	4,6667E7	
Arcilla	3		1,0000E8
Arena	3		1,0000E8
Sig.		1,000	1,000

**T1B**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Silica	3	6,0000E7	
Arcilla	3	9,3333E7	
Arena	3		5,3333E8
Sig.		,821	1,000

**T1C**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Arcilla	3	8,0000E7	
Silica	3	8,6667E7	
Arena	3		5,0000E8
Sig.		,996	1,000

**T1J**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Arcilla	3	3,3333E7
Silica	3	6,0000E7
Arena	3	8,0000E7
Sig.		,068

**T3A**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Silica	3	6,0000E7	
Arcilla	3	1,0000E8	
Arena	3		2,3333E8
Sig.		,368	1,000

**T3B**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Arcilla	3	7,0000E7	
Silica	3	9,3333E7	
Arena	3		2,3333E8
Sig.		,694	1,000

**T3C**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Arcilla	3	7,0000E7	
Silica	3	7,6667E7	
Arena	3		2,6667E8
Sig.		,976	1,000

**T3D**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Arcilla	3	4,3333E7	
Silica	3	5,6667E7	5,6667E7
Arena	3		8,6667E7
Sig.		,603	,140

ANOVA de un factor general para actividad solubilizadora de fósforo

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
MCR24	Inter-grupos	991,739	5	198,348	4,614	,014
	Intra-grupos	515,900	12	42,992		
	Total	1507,639	17			
T3A	Inter-grupos	233,229	5	46,646	1,494	,263
	Intra-grupos	374,546	12	31,212		
	Total	607,776	17			
T3C	Inter-grupos	507,205	5	101,441	42,600	,000
	Intra-grupos	28,575	12	2,381		
	Total	535,780	17			

Tukey

**MCR24**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Glicerol 20%	3	20,0433	
Liofilización	3	22,5367	
Arcilla	3	26,6533	26,6533
Arena	3	27,8633	27,8633
Silica	3	30,5233	30,5233
Glicerol 30%	3		43,1833
Sig.		,417	,078

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

### T3A

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Glicerol 30%	3	39,0167
Arena	3	44,6300
Glicerol 20%	3	45,2600
Arcilla	3	45,2600
Silica	3	46,3233
Liofilización	3	51,3633
Sig.		,145

### T3C

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Glicerol 20%	3	,4367		
Silica	3	2,4667		
Arcilla	3		6,8767	
Arena	3		8,3733	
Liofilización	3			13,5067
Glicerol 30%	3			15,0567
Sig.		,607	,834	,815

### ANOVA de un factor para MCR24

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	991,739	5	198,348	4,614	,014
Intra-grupos	515,900	12	42,992		
Total	1507,639	17			

## Tukey MCR24

### HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Glicerol 20%	3	20,0433	
Liofilización	3	22,5367	
Arcilla	3	26,6533	26,6533
Arena	3	27,8633	27,8633
Silica	3	30,5233	30,5233
Glicerol 30%	3		43,1833
Sig.		,417	,078

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

## ANOVA de un factor para T3A

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	233,229	5	46,646	1,494	,263
Intra-grupos	374,546	12	31,212		
Total	607,776	17			

## Tukey T3A

### HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Glicerol 30%	3	39,0167
Arena	3	44,6300
Glicerol 20%	3	45,2600
Arcilla	3	45,2600
Silica	3	46,3233
Liofilizacion	3	51,3633
Sig.		,145

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANOVA de un factor para T3C

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	507,205	5	101,441	42,600	,000
Intra-grupos	28,575	12	2,381		
Total	535,780	17			

Tukey T3C

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Glicerol 20%	3	,4367		
Silica	3	2,4667		
Arcilla	3		6,8767	
Arena	3		8,3733	
Liofilizacion	3			13,5067
Glicerol 30%	3			15,0567
Sig.		,607	,834	,815

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

### ANEXO 3

#### Medios de cultivo

##### Agar Czapek

Componente	Concentración g/L
Sacarosa	30.0 g
Nitrato de sodio	2.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de potasio	0.5 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Agar	15.0 g

Mezclar todos los componentes y adicionar agua destilada, seguido a ello medir el PH el cual se debe ajustar a un rango de  $7.3 \pm 0.2$ , finalmente autoclavar a (15 lb y 121°C) por 15 minutos, servir en cajas de Petri estériles.

##### Agar Avena

Componente	Concentración g/L
Avena	15.0 g
Agar	15.0 g

Mezclar todos los componentes y adicionar agua destilada, seguido a ello medir el PH el cual se debe ajustar a 7.0, finalmente autoclavar a (15 lb y 121°C) por 15 minutos, servir en cajas de Petri estériles.

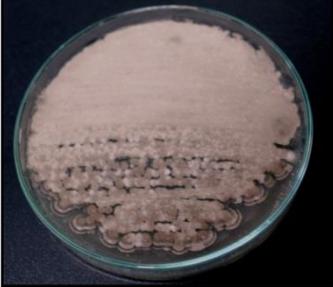
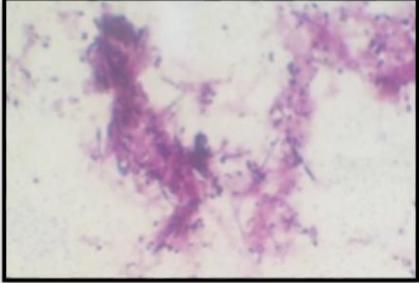
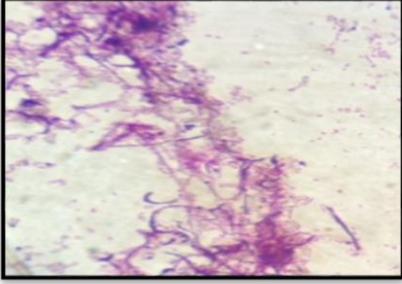
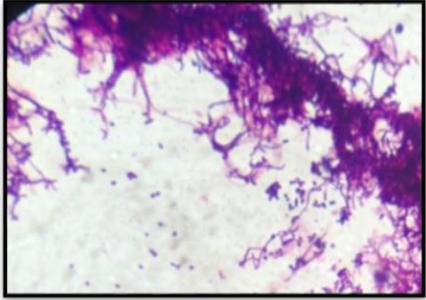
##### NBRIP

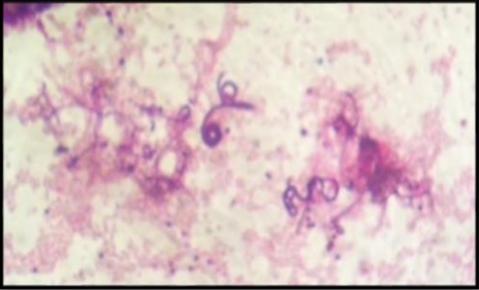
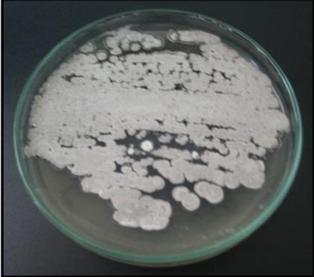
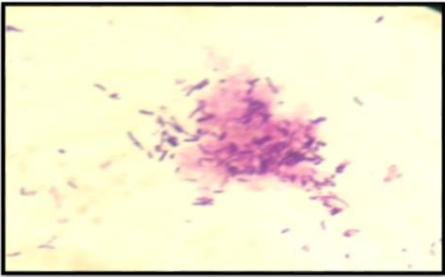
Componente	Concentración g/L
Glucosa	10.0 g
Fosfato tricálcico	5.0 g
Cloruro de magnesio hexahidratado	5.0 g
Sulfato de amonio	0.1 g
Cloruro de sodio	0.2 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.25 g
Cloruro de potasio	0.2 g
H2O destilada	1 L

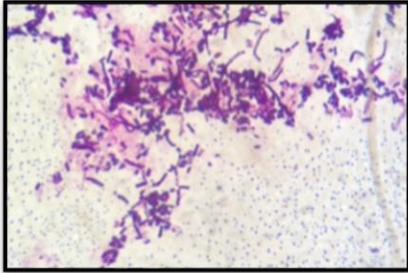
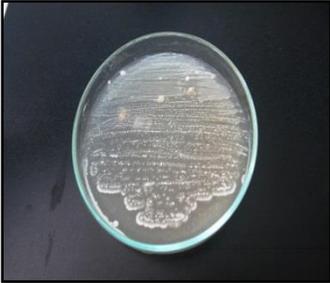
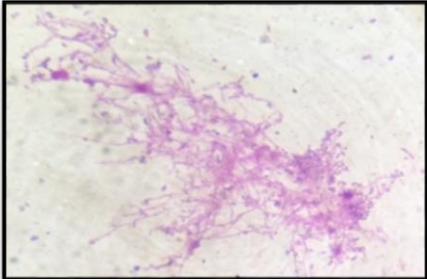
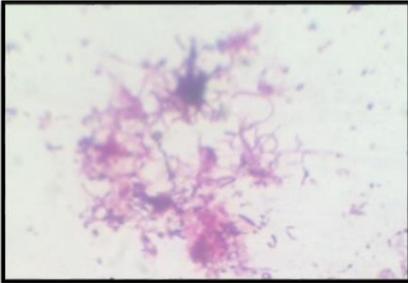
Mezclar todos los componentes y adicionar agua destilada, seguido a ello medir el pH el cual debe ajustarse a 7.0. En caso de ser sólido añadir agar-agar según las especificaciones de la casa comercial. Autoclavar (15 lb y 121°C) y servir en Erlenmeyer o cajas de Petri estériles. El medio NBRIP puede ser modificado añadiendo azul de bromofenol (BPB) a una concentración de 0.025 mg/mL, designado al medio NBRIP-BPB.

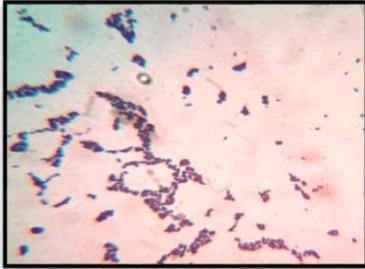
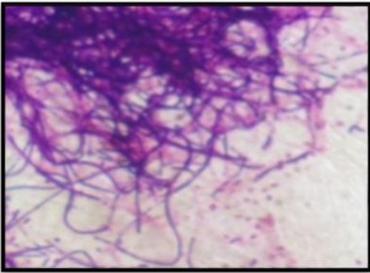
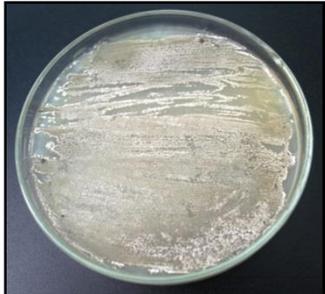
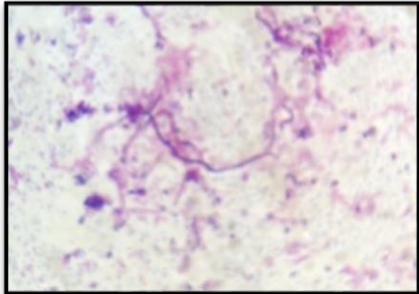
**ANEXO 4**

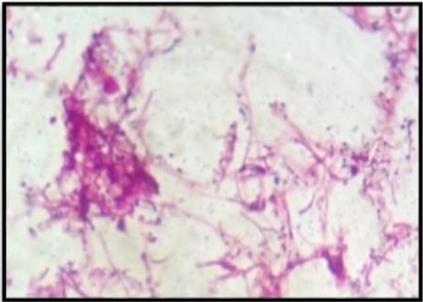
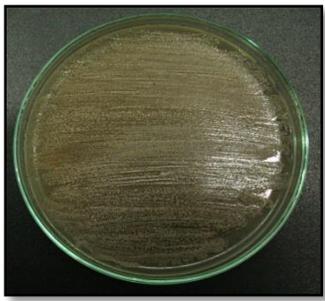
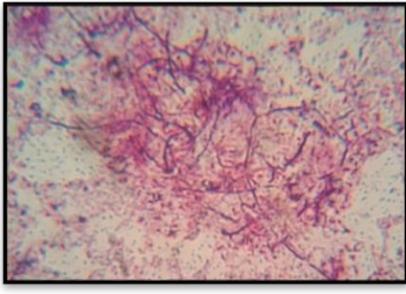
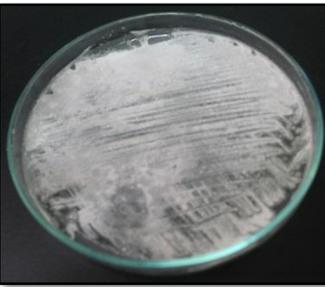
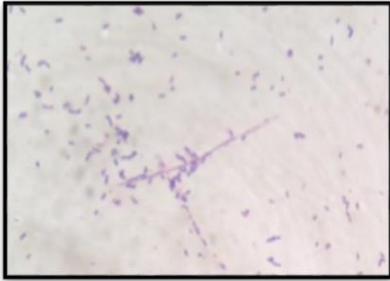
Morfología inicial de Transferencia periódica

<b>Macroscopía</b>	<b>Microscopía</b>
<p>MCR1</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Marrón claro a oscuro. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón oscuro, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentar, tortuoso. Conidios sueltos en alta cantidad.</p>
<p>MCR9</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Marrón claro. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón oscuro, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, tortuoso, cadenas sencillas de conidios.</p>
<p>MCR24</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Blanco a amarillo. <b>Pigmento difusible al medio:</b> Amarillo pálido.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, tortuoso, conidios sencillos en alta cantidad.</p>

<p>MCR26</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Marrón claro. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón claro, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentar, tortuoso y en espiral.</p>
<p>L3A</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Seca compacta. <b>Color reverso:</b> Blanco, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Ausencia de micelio, cadenas largas de conidios.</p>
<p>L4B</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco a gris. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Gris, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Poco micelio, cadenas cortas de conidios, pocos conidios en forma bacilar.</p>

<p>L4C</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco a gris. <b>Textura:</b> Correosa. <b>Color reverso:</b> Gris oscuro, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, cadenas cortas de conidios, los cuales se observan sueltos en forma bacilar.</p>
<p>M2A</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Blanco no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, cadenas largas de conidios no fragmentados.</p>
<p>T1B</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco a marrón claro. <b>Textura:</b> Correosa. <b>Color reverso:</b> Marrón claro, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, tortuoso. Cadenas sencillas de conidios.</p>

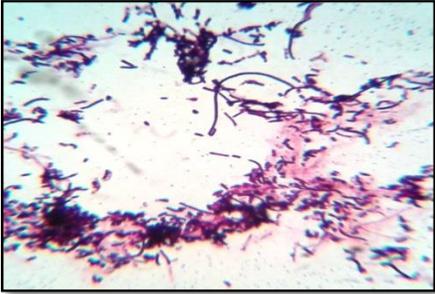
<p>T1C</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco a gris. <b>Textura:</b> Correosa, pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Gris, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, no tortuoso, cadenas largas de conidios.</p>
<p>T1J</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Blanco, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentar, tortuoso. Conidios en poca cantidad.</p>
<p>T3A</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Gris oscuro. <b>Textura:</b> Correosa. <b>Color reverso:</b> Marrón oscuro, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, cadenas cortas de conidios, los cuales se observan en alta cantidad en forma bacilar.</p>

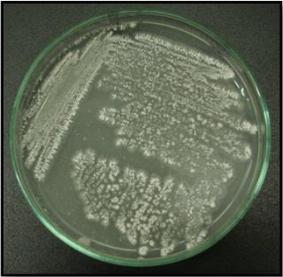
<p>T3B</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco a marrón claro. <b>Textura:</b> pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón claro, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, tortuoso. Cadenas sencillas de conidios.</p>
<p>T3C</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Marrón claro, <b>textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón oscuro, no presenta pigmento difusible al medio</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, tortuoso. Cadenas cortas de conidios.</p>
<p>T3D</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco <b>textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Blanco, no presenta pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, escaso, tortuoso, cadenas sencillas de conidios, los cuales se observan en forma bacilar.</p>

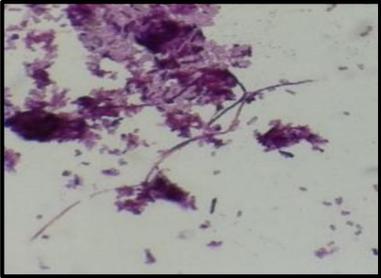
Morfología final de Transferencia periódica

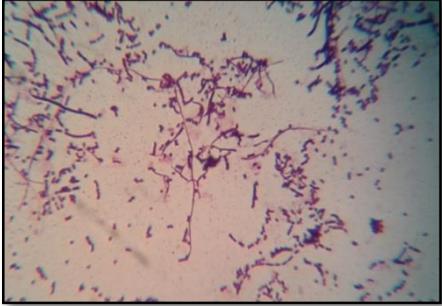
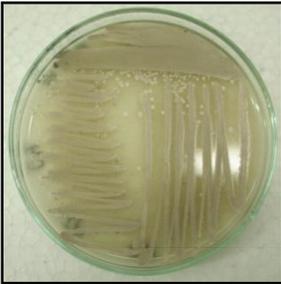
**Macroscopía**

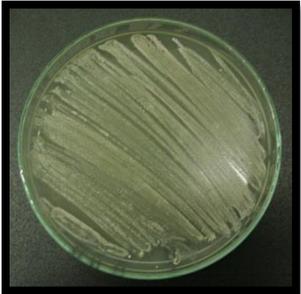
**Microscopía**

<p>MCR1</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Café-crema claro. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón oscuro. Sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentar, conidios simples sueltos en gran cantidad.</p>
<p>MCR9</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Café-crema. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón oscuro. Sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentar, tortuoso con conidios sueltos.</p>
<p>MCR24</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Gris. <b>Textura:</b> Pulverulenta, seca. <b>Color reverso:</b> Amarillo claro. <b>Pigmento difusible al medio:</b> Amarillo pálido.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, tortuoso, conidios simples.</p>

<p>MCR26</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Marrón claro. <b>Textura:</b> Seca. <b>Color reverso:</b> Marrón claro, Sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentar, tortuoso en espiral.</p>
<p>L3A</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco grisáceo. <b>Textura:</b> Seca compacta. <b>Color reverso:</b> Blanco. Sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Ausencia de micelio, cadenas cortas de conidios.</p>
<p>L4B</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco grisáceo. <b>Textura:</b> Pulverulenta, seca. <b>Color reverso:</b> Gris. Sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado con cadenas cortas de conidios retinaculaperti.</p>

<p>L4C</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Correosa y seca.  <b>Color reverso:</b> Gris medio. Sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Poco micelio, fragmentado, con conidios sueltos.</p>
<p>M2A</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Pulverulenta.  <b>Color reverso:</b> Blanco, sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Cadenas largas de conidios, micelio vegetativo sin fragmentar.</p>
<p>T1B</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco crema. <b>Textura:</b> Seca correosa. <b>Color reverso:</b> Café claro. Sin pigmento difusible al medio</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, cadenas largas de conidios con pocos conidios libres.</p>

<p>T1C</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Gris claro. Sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado con cadenas largas de conidios y presencia de conidios sencillos.</p>
<p>T1J</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Café. <b>Textura:</b> Lisa. <b>Color reverso:</b> Café claro. Sin pigmento difusible al medio</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, baja presencia de conidios y cadenas cortas de conidios.</p>
<p>T3A</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Gris oscuro. <b>Textura:</b> Correosa y seca. <b>Color reverso:</b> Gris, sin pigmento difusible al medio.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado con cadenas cortas de conidios y conidios sencillos en baja cantidad.</p>

<p>T3B</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Café claro. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Marrón claro, pigmento difusible al medio: no presenta.</p>	<p>Micelio vegetativo sin fragmentar, tortuoso con cadenas sencillas de conidios.</p>
<p>T3C</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Gris claro. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Blanco, sin pigmento difusible al medio</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, presenta conidios sencillos.</p>
<p>T3D</p> 	
<p><b>Color anverso:</b> Blanco. <b>Textura:</b> Pulverulenta. <b>Color reverso:</b> Blanco, pigmento difusible al medio: no presenta.</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, escaso, tortuoso, cadenas sencillas de conidios, los cuales se observan de forma bacilar.</p>

## ANEXO 5

### PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR EL FÓSFORO SOLUBLE POR LA TÉCNICA DE AZUL DE FOSFOMOLIBDENO-

Análogo al protocolo de la EPA N° 365.2.

#### Preparación solución stock de fósforo soluble:

Disolver en agua destilada 0,2197 g de fosfato dihidrógeno de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) previamente secado en un horno a 105°C, diluir la solución a 1000 mL; 1 mL: 0,05 mg de fósforo.

#### Preparación solución estándar de fósforo soluble:

Diluir 10 mL de la solución stock de fósforo soluble a 1000 mL de agua destilada; 1 mL: 0,5 µg de fósforo.

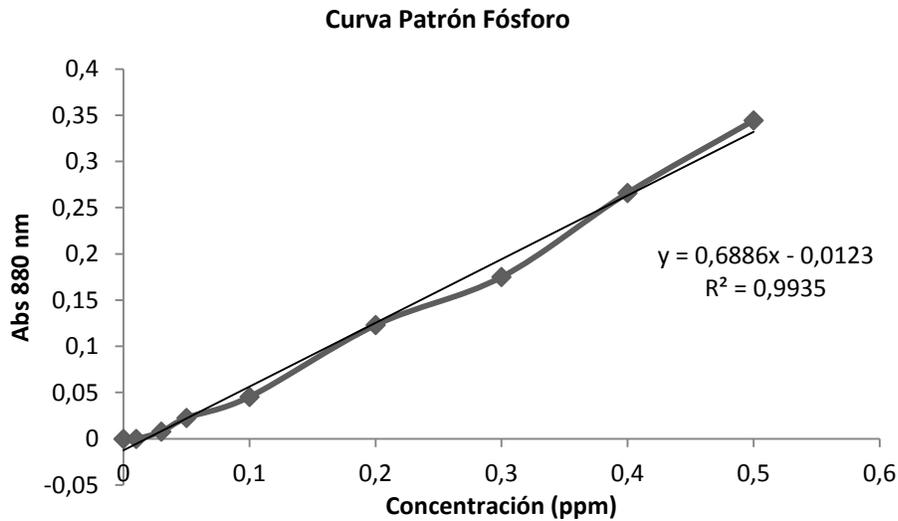
#### Preparación de las soluciones con concentración conocida:

Empleando la fórmula  $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$  se prepararon soluciones de concentraciones conocidas (g/L) con un volumen final de 50 mL a partir de la solución estándar de fósforo soluble; con el fin de realizar la curva de calibración.

Concentración mg/L	Volumen de solución estándar de P soluble (mL)	Volumen de Agua Destilada (mL)
0,00	0	50
0,01	1	49
0,03	3	47
0,05	5	45
0,10	10	40
0,20	20	30
0,30	30	20
0,40	40	10
0,50	50	0

(Prada-Salcedo 2013)

## Representación gráfica



### Determinación de fósforo soluble mediante el método de Azul de fosfomolibdeno por el Test Spectroquant de Merck®:

En un tubo de vidrio se siguió el protocolo del fabricante adicionando 5 mL de sobrenadante obtenido a partir de la muestra, el reactivo 1 (iones molibdato en solución sulfúrica) y el reactivo 2 (ácido ascórbico), esta mezcla se agitó vigorosamente hasta que el reactivo disolvió completamente. Esta solución se dejó reposar durante 5 minutos (Tiempo de reacción, en que se debe visualizar una coloración azul). Posteriormente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 880 nm, ajustando el cero de absorbancia tomando como blanco de prueba los reactivos sin concentración de ortofosfato; finalmente, se reportó el fosfato soluble extrapolando las absorbancias a través de la curva patrón (Prada-Salcedo 2013).

## ANEXO 6

### ANALISIS DE COSTOS

Insumos	Costo (COP)
Glicerol (1000 mL)	199.000
Puntas azules (caja por 1000 UNDS)	35.000
Kit Spectroquant Merk®	479.600
Cajas Petri (UND)	2.250
Alcohol Industrial (Galón)	15.000
Eppendorff de 1,5 mL (1000 UNDS)	46.000
Puntas amarillas (caja por 1000 UNDS)	24.000
Agar-Agar (500 g)	176.132
Agar Czapek (500 g)	166.000
Avena Molida ( 500 g)	2.586
Viales de 50 mL (360 UNDS)	248.000
Celdas de cuarzo de 3 mL (4 UNDS)	1.400.000
Jeringas 3 mL (100 UNDS)	27.300
Cajas plásticas (500 UNDS)	100.000
Cajas de criopreservación de colores (4 UNDS)	72.000
Silica gel (1000 g)	133.000
Parafilm	60.000
Viales ámbar 2mL (290 UNDS)	185.000
Tapas y grafas (290 UNDS)	90.000
Incubadora	4.000.000
Cabina de flujo laminar	3.600.000
Autoclave	3.800.000
Horno	1.200.000
Balanzas	600.000
Centrifuga	1.500.000
Liofilizador	30.000.000
Freezer (-180°C)	15,000.000
Congelador ( -20°C )	8,000.000
Refrigerador (-4°C)	1,000.000
Espectofotómetro	1,600.000
Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (1 UND)	1.800
Arcilla	20.000
Gradilla Plastica	38.000
Fiolas 50 mL (1UND)	9.000
Schott 1000 mL	22.000
Probeta 250 mL	67.500
Shaker	13.000.000
Papelería	100.000
Micropipetas (0,5-10µL;10 -100µL; 100-1000µL)	500.000

Skim Milk (500 g)

78.000

---

**Total Insumos**

87.597.168

---

**Liofilización**

<b>Insumos</b>	<b>Costo (COP)</b>
Puntas azules (caja por 143 UNDS)	5.000
Kit Spectroquant Merk®	479.600
Cajas Petri ( 135 UNDS)	337.500
Alcohol Industrial (0.38 Galónes)	5.791
Puntas amarillas (caja por 143 UNDS)	3.432
Agar-Agar (13.5 g)	4.755
Agar Czapek (22.54 g)	7.483
Avena Molida (13.5 g)	70
Celdas de cuarzo de 3 mL(4 UNDS)	1.400.000
Jeringas 3 mL (115 UNDS)	31.395
Cajas plásticas (59 UNDS)	11.800
Parafilm	60.000
Viales ámbar. 2mL (105 UNDS)	66.982
Tapas y grafas (105 UNDS)	32.586
Incubadora	4.000.000
Cabina de flujo laminar	3.600.000
Autoclave	3.800.000
Balanzas	600.000
Centrifuga	1.500.000
Liofilizador	30.000.000
Refrigerador (-4°C)	1,000.000
Espectofotómetro	1,600.000
Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (27 UNDS)	48.600
Gradilla Plastica	38.000
Fiolas 50 mL (9 UND)	81.000
Schott 1000 mL (2 UND)	44.000
Shaker	13.000.000
Micropipetas (0,5-10µL;10 - 100µL; 100-1000µL)	500.000
Skim Milk (162g)	25.272
Probeta 250 mL	67.500
<b>Total</b>	<b>59.750.766</b>

<b>Insumos</b>	<b>Costo (COP)</b>
Glicerol (10.6 mL)	2.110

	Puntas azules (caja por 143 UNDS)	5.000
	Kit Spectroquant Merk®	479.600
	Cajas Petri ( 135 UNDS)	337.500
	Alcohol Industrial (0.38 Galónes)	5.791
	Puntas amarillas (caja por 143 UNDS)	3.432
	Agar-Agar (13.5 g)	4.755
	Agar Czapek (22.54 g)	7.483
	Avena Molida (13.5 g)	70
	Celdas de cuarzo de 3 mL(4 UNDS)	1.400.000
	Cajas plásticas (59 UNDS)	11.800
	Cajas de criopreservación de colores (2 UNDS)	36.000
<b>Glicerol al 20%</b>	Parafilm	60.000
	Eppendorff de 1,5 mL (105 UNDS)	4.830
	Incubadora	4.000.000
	Cabina de flujo laminar	3.600.000
	Autoclave	3.800.000
	Balanzas	600.000
	Centrifuga	1.500.000
	Congelador ( -20°C )	8.000.000
	Espectofotómetro	1.600.000
	Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (27 UNDS)	48.600
	Gradilla Plástica	38.000
	Fiolas 50 mL (9 UND)	81.000
	Schott 1000 mL (2 UND)	44.000
	Shaker	13.000.000
	Micropipetas (0,5-10µL;10 - 100µL; 100-1000µL)	500.000
	Probeta 250 mL	67.500
	<b>Total</b>	<b>39.237.471</b>

	<b>Insumos</b>	<b>Costo (COP)</b>
	Glicerol (15.90 mL)	3.165
	Puntas azules (caja por 143 UNDS)	5.000
	Kit Spectroquant Merk®	479.600
	Cajas Petri ( 135 UNDS)	337.500
	Alcohol Industrial (0.38 Galónes)	5.791
	Puntas amarillas (caja por 143 UNDS)	24.000
	Agar-Agar (13.5 g)	4.755
	Agar Czapek (22.54 g)	7.483
	Avena Molida (13.5 g)	70
	Celdas de cuarzo de 3 mL(4 UNDS)	1.400.000
	Cajas plásticas (59 UNDS)	11.800
	Cajas de criopreservación de colores (2 UNDS)	36.000
	Parafilm	60.000
	Eppendorff de 1,5 mL (105 UNDS)	4.830
	Incubadora	4.000.000
	Cabina de flujo laminar	3.600.000
	Autoclave	3.800.000
	Balanzas	600.000
	Centrifuga	1.500.000
	Freezer (-180°C)	15.000.000
	Espectofotómetro	1.600.000
	Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (27 UNDS)	48.600
	Gradilla Plastica	38.000
	Fioles 50 mL (9 UNDS)	81.000
	Schott 1000 mL (2 UNDS)	44.000
	Shaker	13.000.000
	Micropipetas (0,5-10µL;10 - 100µL; 100-1000µL)	500.000
	Probeta 250 mL	67.500
<b>Glicerol al 30%</b>	<b>Total</b>	<b>46.254.094</b>

	<b>Insumos</b>	<b>Costo (COP)</b>
	Puntas azules (caja por 143 UNDS)	5.000
	Kit Spectroquant Merk®	479.600
	Cajas Petri ( 135 UNDS)	337.500
	Alcohol Industrial (0.38 Galónes)	5.791
	Puntas amarillas (caja por 143 UNDS)	24.000
	Agar-Agar (13.5 g)	4.755
	Agar Czapek (22.54 g)	7.483
	Avena Molida (13.5 g)	70
	Viales de 50 mL (105 UNDS)	72.333
Arena	Celdas de cuarzo de 3 mL(4 UNDS)	1.400.000
	Cajas plásticas (59 UNDS)	11.800
	Parafilm	60.000
	Incubadora	4.000.000
	Cabina de flujo laminar	3.600.000
	Autoclave	3.800.000
	Balanzas	600.000
	Centrifuga	1.500.000
	Refrigerador (-4°C)	1.000.000
	Espectofotómetro	1.600.000
	Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (27 UNDS)	48.600
	Gradilla Plastica	38.000
	Fioles 50 mL (9 UNDS)	81.000
	Schott 1000 mL (2 UNDS)	44.000
	Shaker	13.000.000
	Micropipetas (0,5-10µL;10 - 100µL; 100-1000µL)	500.000
	Probeta 250 mL	67.500
	<b>Total</b>	<b>32.287.432</b>

	<b>Insumos</b>	<b>Costo (COP)</b>
	Puntas azules (caja por 143 UNDS)	5.000
	Kit Spectroquant Merk®	479.600
	Cajas Petri ( 135 UNDS)	337.500
	Alcohol Industrial (0.38 Galónes)	5.791
	Puntas amarillas (caja por 143 UNDS)	24.000
	Agar-Agar (13.5 g)	4.755
	Agar Czapek (22.54 g)	7.483
	Avena Molida (13.5 g)	70
	Viales de 50 mL (105 UNDS)	72.333
	Celdas de cuarzo de 3 mL(4 UNDS)	1.400.000
Arcilla	Cajas plásticas (59 UNDS)	11.800
	Parafilm	60.000
	Incubadora	4.000.000
	Cabina de flujo laminar	3.600.000
	Horno	1.200.000
	Balanzas	600.000
	Centrifuga	1.500.000
	Refrigerador (-4°C)	1.000.000
	Espectofotómetro	1.600.000
	Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (27 UNDS)	48.600
	Arcilla	20.000
	Silica (210 g)	27.930
	Gradilla Plastica	38.000
	Fioles 50 mL (9 UND)	81.000
	Schott 1000 mL (2 UND)	44.000
	Shaker	13.000.000
	Micropipetas (0,5-10µL;10 - 100µL; 100-1000µL)	500.000
	Probeta 250 mL	67.500
	<b>Total</b>	<b>29.735.362</b>

	<b>Insumos</b>	<b>Costo (COP)</b>
	Puntas azules (caja por 143 UNDS)	5.000
	Kit Spectroquant Merk®	479.600
	Cajas Petri ( 135 UNDS)	337.500
	Alcohol Industrial (0.38 Galónes)	5.791
	Puntas amarillas (caja por 143 UNDS)	24.000
	Agar-Agar (13.5 g)	4.755
	Agar Czapek (22.54 g)	7.483
	Avena Molida (13.5 g)	70
	Skim Milk (162 g)	25.272
	Viales de 50 mL (105 UNDS)	72.333
Sílica Gel	Celdas de cuarzo de 3 mL(4 UNDS)	1.400.000
	Cajas plásticas (59 UNDS)	11.800
	Parafilm	60.000
	Incubadora	4.000.000
	Cabina de flujo laminar	3.600.000
	Autoclave	3.800.000
	Balanzas	600.000
	Centrifuga	1.500.000
	Refrigerador (-4°C)	1.000.000
	Espectofotómetro	1.600.000
	Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (27 UNDS)	48.600
	Silica (525 g)	69.825
	Gradilla Plastica	38.000
	Fiolas 50 mL (9 UND)	81.000
	Schott 1000 mL (2 UND)	44.000
	Shaker	13.000.000
	Micropipetas (0,5-10µL;10 - 100µL; 100-1000µL)	500.000
	Probeta 250 mL	67.500
	<b>Total</b>	<b>32.382.529</b>

	<b>Insumos</b>	<b>Costo (COP)</b>
	Puntas azules (caja por 143 UNDS)	5.000
	Kit Spectroquant Merk®	479.600
	Cajas Petri ( 135 UNDS)	337.500
	Alcohol Industrial (0.38 Galónes)	5.791
	Puntas amarillas (caja por 143 UNDS)	24.000
	Agar-Agar (13.5 g)	4.755
	Agar Czapek (22.54 g)	7.483
	Avena Molida (13.5 g)	70
	Celdas de cuarzo de 3 mL(4 UNDS)	1.400.000
Transferencia Periódica	Cajas plásticas (59 UNDS)	11.800
	Parafilm	60.000
	Incubadora	4.000.000
	Cabina de flujo laminar	3.600.000
	Autoclave	3.800.000
	Balanzas	600.000
	Centrifuga	1.500.000
	Refrigerador (-4°C)	1.000.000
	Espectofotómetro	1.600.000
	Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (27 UNDS)	48.600
	Gradilla Plastica	38.000
	Fioles 50 mL (9 UNDS)	81.000
	Schott 1000 mL (2 UNDS)	44.000
	Shaker	13.000.000
	Micropipetas (0,5-10µL;10 - 100µL; 100-1000µL)	500.000
	Probeta 250 mL	67.500
	<b>Total</b>	<b>32.215.099</b>

<b>Insumos Consumido</b>	<b>Costo (COP)</b>
Glicerol (26,5 mL)	5.275
Puntas azules (1001 UNDS)	35.000
Kit Spectroquant Merk®	479.600
Cajas Petri (945 UNDS)	2.362.500
Alcohol Industrial 2,7 Galónes	40.540
Eppendorff de 1,5 mL (210 UNDS)	9.660
Puntas amarillas (1001 UNDS)	24.024
Agar-Agar (94,5 g)	33.285
Agar Czapek (157,178 g)	52.381
Avena Molida (94,5 g)	490
Viales de 50 mL (315 UNDS)	216.999
Celdas de cuarzo de 3 mL (4 UNDS)	1.400.000
Jeringas 3 mL (115 UNDS)	31.395
Cajas plásticas (413 UNDS)	82.600
Cajas de criopreservación de colores (4 UNDS)	72.000
Silica gel (735 g)	97.755
Parafilm	60.000
Viales ámbar 2mL (105 UNDS)	66.982
Tapas y grafas (105 UNDS)	32.586
Incubadora	4.000.000
Cabina de flujo laminar	3.600.000
Autoclave	3.800.000
Horno	1.200.000
Balanzas	600.000
Centrifuga	1.500.000
Liofilizador	30.000.000
Freezer (-180°C)	15,000.000
Congelador ( -20°C )	8,000.000
Refrigerador (-4°C)	1,000.000
Espectofotómetro	1,600.000
Tubos tapa rosca 13 x 100 mm (189 UNDS)	340.200
Arcilla	20.000
Gradilla Plastica (7 UNDS)	266.000
Fiolas 50 mL (63 UNDS)	567.000
Schott 1000 MI (14 UNDS)	308.000
Probeta (250 mL)	67.500
Shaker	13.000.000
Papelería	100.000
Micropipetas (0,5-10µL;10 -100µL; 100-1000µL)	500.000
Skim Milk ( 324 g)	50.544

---

**Total Insumos Consumidos**

90.622.316

---