

**Evaluación de la estabilidad de propiedades de
promoción del crecimiento en tres aislamientos nativos
de *Gluconacetobacter* spp., conservados mediante
criopreservación a -80°C**

CARLOS MARIO GONZÁLEZ GARCÍA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2019**

**Evaluación de la estabilidad de propiedades de
promoción del crecimiento en tres aislamientos nativos
de *Gluconacetobacter* spp., conservados mediante
criopreservación a -80°C**

CARLOS MARIO GONZÁLEZ GARCÍA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar
al título de:
Magister en Microbiología Agroindustrial**

Directora:

GLORIA MARÍA RESTREPO FRANCO

Codirector:

NARMER FERNANDO GALEANO VANEGAS

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2019**

Acta de calificación

**Evaluación de la estabilidad de propiedades de
promoción del crecimiento en tres aislamientos nativos
de *Gluconacetobacter* spp., conservados mediante
ciopreservación a -80°C**

CARLOS MARIO GONZÁLEZ GARCÍA

**Tesis para optar el título de:
Magister en Microbiología Agroindustrial**

Nota de aceptación Jurado:

Jurado

Tabla de contenido

Resumen	3
Abstract	3
1. Introducción.....	5
2. Objetivos.....	7
2.1. Objetivo general.....	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. Referente teórico.....	8
3.1. Generalidades.....	8
3.2. Preservación de microorganismos	9
3.2.1. Métodos de conservación.....	10
3.3. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal y sus características	11
3.3.1. Género Gluconacetobacter spp.	11
3.3.2. Gluconacetobacter diazotrophicus y Gluconacetobacter sacchari como BPCV	12
3.3.3. Fijación biológica de nitrógeno	13
3.3.4. Solubilización de fosfatos	14
3.3.5. Producción de fitohormonas	14
3.3.6. Inhibición de crecimiento de patógenos	14
4. Materiales y métodos.....	17
4.1. Tipo de estudio.....	17
4.2. Ubicación	17
4.3. Aislamientos del estudio.....	17
4.4. Análisis estadístico.....	17
4.5. Preparación del inóculo.....	17
4.6. Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos	18
4.7. Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA)	18
4.8. Determinación de las propiedades de inhibición de crecimiento.....	19
4.8.1. Pruebas duales.....	19
4.8.2. Interacción bacteria-hongo a través de compuestos volátiles orgánicos	19
5. Resultados y discusión	20
5.1. Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos	20
5.1.1. Fosfato tricálcico.....	20
5.1.2. Fosfato de hierro	21
5.1.3. Fosfato de aluminio	23
5.2. Determinación de ácido indolacético.....	25
5.3. Determinación de propiedades de inhibición de crecimiento	26
5.3.1. Pruebas duales.....	26
5.3.2. Interacción bacteria-hongo a través de compuestos volátiles orgánicos	27
5.4. Modelación del comportamiento de las variables.....	28
6. Conclusiones.....	31
7. Recomendaciones	32
8. Referencias bibliográficas	33

Lista de tablas

Tabla 1. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico, de los aislamientos preservados entre los años 2014 y 2018.....	21
Tabla 2. Análisis de varianza (0,05) para el índice de solubilización (IS) de fosfato de hierro, de los aislamientos preservados entre los años 2014 y 2018.	22
Tabla 3. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de solubilización (IS) de fosfato de aluminio, de los aislamientos preservados entre los años 2014 y 2018.....	24
Tabla 4. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para la producción de AIA de los aislamientos preservados y evaluados entre el 2014 y 2018.	26
Tabla 5. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol en los años 2014 y 2018.....	27
Tabla 6. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol de compuestos volátiles orgánicos, en el año 2018.....	28

Lista de figuras

Figura 1. Determinación del diámetro de la colonia (B) y del halo de solubilización (A). (a) Esquema. (b) Fotografía de imagen real.....	18
Figura 2. Halos de solubilización obtenidos con la fuente de fosfato tricálcico, empleando el medio NBRIP.	20
Figura 3. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05).....	21
Figura 4. Halos de solubilización obtenidos con la fuente de fosfato de hierro, empleando el medio NBRIP.	22
Figura 5. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico. Análisis de varianza (0,05).	23
Figura 6. Halos de solubilización obtenidos con la fuente de fosfato de aluminio, empleando el medio NBRIP.	23
Figura 7. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de solubilización (IS) de fosfato de aluminio. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05).....	25
Figura 8. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014, 2016 y 2018, en la variable producción de AIA. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05).....	26
Figura 9. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05).....	27
Figura 10. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos en el año 2018, en la variable índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol de compuestos volátiles orgánicos. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05)	28
Figura 11. Análisis de los componentes principales para determinar el comportamiento general de la capacidad de crecimiento vegetal de <i>Gluconacetobacter</i> spp. mantenidas en criopreservación durante 4 años.	29
Figura 12. <i>Heatmap</i> que representa el comportamiento de las cepas de <i>Gluconacetobacter</i> spp. con respecto a su capacidad de promoción de crecimiento vegetal en el tiempo.	30
Figura 13. Dendograma que muestra el análisis de agrupamiento de las cepas de <i>Gluconacetobacter</i> spp. conservadas en criopreservación con respecto al tiempo y la capacidad de promoción de crecimiento.	30

Agradecimientos

Instituciones y oficinas

A la Universidad Católica de Manizales-UCM por su apoyo para la realización de la Maestría en Microbiología Agroindustrial. Al Grupo de Investigaciones Biológicas-GIBI, por el apoyo durante el desarrollo de la investigación.

Doctores e investigadores

A la Dra. Gloria María Restrepo Franco, Directora del trabajo de grado, por todas sus enseñanzas a lo largo del desarrollo de la Maestría, por su paciencia y perseverancia conmigo para poder realizar este trabajo de grado y terminar el presente documento. Su frase fue “La perseverancia logra lo que la dicha no alcanza”.

Al profesor Narmer Fernando Galeano Vanegas, Codirector del trabajo de grado, por su acompañamiento y consejos en el análisis de la información y escritura del trabajo de grado.

Otras personas

Al Dr. Andrés Mauricio Villegas, compañero y amigo, porque siempre está presto para brindar todo su apoyo y consejos académicos cuando se le requiere.

A todos mis compañeros y amigos de la Maestría, siempre prestos a compartir sus conocimientos y brindar su ayuda durante estos años de estudio.

Agradecimientos personales

A mi Madre, porque siempre ha estado presente y su apoyo es constante e incondicional en todos los aspectos de mi vida. A mis amigos Mara y Jesús David porque siempre estuvieron apoyándome en todo el desarrollo de la Maestría.

Resumen

A partir del proyecto “Obtención y evaluación de un promotor para el crecimiento de cultivos de tomate y zanahoria a base de *Gluconacetobacter diazotrophicus*” se obtuvieron 86 aislamientos de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal recuperadas a partir de cultivos de caña de azúcar, tomate y zanahoria, con potencial en el desarrollo de bioinsumos agrícolas (Restrepo, 2014). Los aislamientos recuperados se consignaron en la Colección de Microorganismos de la UCM. Debido a esto surgió la necesidad de mantener la viabilidad y las características de los aislamientos, para facilitar la continuidad de las investigaciones proyectadas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la estabilidad de propiedades de promoción del crecimiento vegetal en tres aislamientos nativos de *Gluconacetobacter* spp., conservados mediante criopreservación a -80°C durante 4 años, con dos tiempos de evaluación 2014 y 2018. Para tales fines la cepa ATCC 49037 de *G. diazotrophicus* fue usada como patrón y se evaluaron características como la solubilización de fofatos, producción de ácido indolacético y la inhibición de crecimiento de Fol. Los resultados mostraron que para la solubilización de Ca_3PO_4 , AlPO_4 y FePO_4 no hubo diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y la cepa control, se presentaron diferencias en la solubilización de Ca_3PO_4 para los años 2014 y 2018, siendo el año 2018 el que presentó mejor índice de solubilización (IS); para la solubilización de AlPO_4 hubo diferencias entre los años 2014, 2016 y 2018, en general el menor IS lo presentó el año 2018. Para la producción de AIA no se reportaron diferencias entre los años evaluados y tampoco entre las cepas con referencia a la cepa patrón. Finalmente en las pruebas de inhibición de crecimiento de Fol tampoco se reportaron diferencias significativas con respecto a los años y al comportamiento de la cepa patrón. Los resultados sugieren que el método de criopreservación a -80°C mantiene dentro de rangos admisibles la estabilidad en el tiempo de las características de promoción de crecimiento de las cepas de *Gluconacetobacter* spp. evaluadas, con respecto a la cepa patrón.

Palabras clave: bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solubilización de fosfatos, ácido indolacético, inhibición de fitopatógenos.

Abstract

From the project "Obtainment and evaluation of one promoter for the growth of tomato and carrot crops based on *Gluconacetobacter diazotrophicus*", 86 isolates of Plant Growth Promoting Bacteria recovered from sugarcane, tomato and carrot crops were obtained, with potential in the development of agricultural bioinputs (Restrepo, 2014). The recovered isolates were stored in the Collection of Microorganisms in the UCM. Due to this, the need arose to maintain the viability and characteristics of the isolations, in order to facilitate the continuity of the projected investigations. The objective of this work was to evaluate the properties stability of plant growth promotion in three native *Gluconacetobacter* spp isolations, preserved by cryopreservation at -80°C for four years, with two times for evaluation 2014 and 2018. For this purpose, strain ATCC 49037 of *Gluconacetobacter diazotrophicus* was used as a reference and characteristics such as phosphate solubilizing,

indolacetic acid production and Fol growth inhibition using dual tests and volatile organic compounds production were evaluated. The results showed that in the solubilizing of Ca_3PO_4 , AlPO_4 , and FePO_4 there were no statistical differences between the strains evaluated and the reference strain, there were differences in the solubilizing of Ca_3PO_4 for the years 2014 and 2018, being IS better in 2018, the AlPO_4 solubilizing does not show differences between the years 2014, 2016 and 2018, in general, the lower IS was presented in 2018. The AIA production does not show differences between the years evaluated and neither with the reference strain. Finally, in the Fol growth inhibition tests, no significant differences were reported concerning the years and the behavior of the reference strain. The results suggest that the cryopreservation method at -80°C can maintain the stability over time of the growth promotion characteristics of the *Gluconacetobacter* spp. strains within acceptable ranges concerning the reference strain evaluated.

Keywords: Microorganism, solubilization, indolacetic acid, inhibition.

1. Introducción

El uso de microorganismos en la industria, en la agricultura, en la investigación y en la vida en general ha sido de gran importancia desde el inicio de las civilizaciones, principalmente han estado asociados a la elaboración de alimentos y bebidas aún desconociendo su existencia. Se podría decir que los microorganismos han pasado de generación en generación con todas las transformaciones, que implica su capacidad de rápida y constante reproducción. En la actualidad se tiene la ventaja de conocer muchas de las cualidades de los microorganismos que permiten identificar su importancia, a través de la realización de investigaciones en las cuales se han reconocido microorganismos con grandes capacidades, que han permitido aportar a la ciencia y al desarrollo industrial. Estas capacidades y aservos genéticos deben ser conservados para posteriores estudios y para la identificación de los usos potenciales que se les puedan dar; así surgen las colecciones microbianas como la mejor forma de conservar dichos recursos genéticos mantenidos de manera estable y segura.

El Grupo de Investigaciones Biológicas (GIBI), de la Universidad Católica de Manizales inició el trabajo en la línea de investigación “Estudio y conservación de la diversidad microbiana” en el año 2000 a través del macroproyecto “Recuperación y preservación de microorganismos de importancia agrícola e industrial”, en el cual se desarrollaron diversos trabajos de investigación, con el apoyo de estudiantes del programa de Bacteriología, realizando aislamiento de microorganismos asociados a residuos agroindustriales como cáscaras de naranja, mandarina, cacao, plátano, mango, lactosuero y lodo de mora. Esta experiencia permitió definir los protocolos para el proceso de recuperación e identificación, de los microorganismos asociados a estos sustratos, los cuales fueron preservados mediante congelación con glicerol al 10%, constituyendo los inicios del perfil de la colección de microorganismos en la Universidad Católica (Vélez, *et al.*, 2018).

Estos resultados suministraron los elementos necesarios para proponer el proyecto “Organización científica de un banco de microorganismos de importancia clínica, agrícola e industrial”. A través de la ejecución del proyecto se identificó el portafolio de servicios que la Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales (CMUCM) podía ofertar. Posteriormente, en el año 2012 se aprobó el proyecto “Sistema de Información de Microorganismos UCM”, el cual permitió organizar la información recolectada hasta el momento, de los microorganismos que estaban integrando la colección. En conclusión la línea de investigación en Estudio y conservación de la diversidad microbiana, ha desarrollado investigaciones asociadas principalmente con la evaluación de métodos de: recuperación de microorganismos, conservación, determinación de la viabilidad e identificación molecular por secuenciación. Dichos microorganismos se han sistematizado y registrado en la CMUCM (Vélez, *et al.*, 2018).

Paralelamente a estas actividades en el año 2009 se institucionalizó la línea de investigación en Bioinsumos, en la cual se ejecutó el proyecto “Obtención y evaluación de un promotor para el crecimiento de cultivos de tomate y zanahoria a base de *Gluconacetobacter diazotrophicus*” el cual fue financiado por la Universidad Católica de

Manizales, la Universidad de Caldas y Colciencias en el marco de la convocatoria 521 del año 2010. A partir de este proyecto, se obtuvieron 86 aislamientos de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) recuperadas a partir de cultivos de caña de azúcar, tomate y zanahoria, con un enorme potencial en la evaluación de la interacción planta-microorganismo y el desarrollo de inoculantes (Restrepo, 2014).

Los aislamientos recuperados en esta investigación se preservaron y consignaron en la Colección de Microorganismos de la UCM. Debido a esto surgió la necesidad de mantener la viabilidad y las características de promoción de crecimiento (fijación biológica de nitrógeno, síntesis de compuestos indólicos como fitohormonas, solubilización de fosfatos y capacidad antagónica, principalmente) de los aislamientos, para facilitar la continuidad de las investigaciones proyectadas. De esta manera se han fusionado los esfuerzos de ambas líneas de investigación en pro de velar por la conservación del potencial de este recurso genético, para avanzar en procesos de investigación, docencia, desarrollo tecnológico e innovación.

Uno de los principales géneros conservados en la Colección es *Gluconacetobacter*, éste comprende diferentes especies de importancia en la agricultura y la industria (Restrepo, *et al.*, 2017). Dentro de las propiedades conocidas para este género se encuentra la promoción del crecimiento vegetal con características como la capacidad de fijación de nitrógeno (Muñoz & Caballero, 2003), la producción de fitohormonas como el ácido indoleacético y el ácido giberélico, la solubilización *in vitro* de macro y micronutrientes como los fosfatos y el control de fitopatógenos como *Colletotrichum falcatum* y *Fusarium oxysporum* (Chawla, *et al.*, 2017).

El presente trabajo aporta información de tres aislamientos nativos de *Gluconacetobacter* spp. provenientes de caña de azúcar, los cuales han demostrado un importante potencial en la promoción de crecimiento de tomate y zanahoria en estudios previos. Lo anterior permitirá a la línea orientar estrategias para el mantenimiento de la viabilidad y las características potenciales de estas bacterias, que faciliten la disposición y acceso al recurso biológico que actualmente se encuentran en perspectiva de ejecutar proyectos de desarrollo tecnológico e innovación.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar la estabilidad de propiedades de promoción del crecimiento en tres aislamientos nativos de *Gluconacetobacter* spp., conservados mediante criopreservación a -80°C y almacenados en la Colección de Microorganismos de la UCM.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la producción de ácido indolacético, la capacidad de solubilización de fosfatos y la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici de los aislamientos GIBI014, GIBI029, GIBI031, luego de 4 años de conservación.
- Interpretar el comportamiento de la producción de ácido indolacético y la solubilización de fosfato tricálcico y de aluminio con base en los datos históricos disponibles en la colección.
- Modelar el comportamiento de las variables de promoción de crecimiento evaluadas.

3. Referente teórico

3.1. Generalidades

Según Janssens, *et al.*, (2010) el inicio de las colecciones microbianas data de finales del siglo XIX, la idea principal de tener las colecciones fue tener repositorios de los recursos biológicos para impulsar el desarrollo de las ciencias. La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) reconoce a este tipo de iniciativas como fuentes sustentables para acceder a dichas fuentes biológicas. Actualmente existen 769 colecciones con más de 3 millones de microorganismos registrados en el *World Data Centre For Microorganisms*, que se encuentran en 76 países alrededor del mundo (World Data Centre for Microorganisms, 2014).

La Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales (CMUCM), es el repositorio de microorganismos administrado por la Universidad Católica de Manizales, la cual está constituida por cuatro sub-colecciones: clínica, agrícola, industria y de referencia. Estas sub-colecciones contienen microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias provenientes de muestras ambientales, de monocultivos, de efluentes y desechos industriales, y aislamientos provenientes de investigaciones en el área clínica. La CMUCM está adscrita al Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial. La colección cuenta con aproximadamente 270 microorganismos, distribuidos en bacterias (39 géneros y 73 especies), hongos filamentosos (7 géneros y 9 especies) y levaduras (3 géneros y 5 especies).

Los microorganismos de la colección han sido clasificados taxonómicamente por medio de métodos tradicionales de acuerdo al manual de Bergey (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) (Brenner, *et al.*, 2005), pruebas bioquímicas comerciales (API y BBL Crystal,) y caracterización molecular (16S, ITS).

La colección cuenta con diferentes sistemas de conservación para asegurar la preservación de los microorganismos, así:

- Bacterias: criopreservación a -80°C en agua destilada estéril y aceite mineral.
- Hongos filamentosos: criopreservación a -80°C para esporulados en agua destilada estéril y aceite mineral (micelio).
- Levaduras: criopreservación a -80°C en agua destilada estéril y aceite mineral. (Universidad Católica de Manizales, 2019)

Las colecciones de microorganismos son como bibliotecas que en lugar de almacenar libros almacenan material vivo, en aras de conservar la diversidad. La primera colección de cultivos microbianos se originó en la escuela de Koch en el año de 1890 en la Universidad Alemana de Praga. La colección de microorganismos más antigua que aún existe se encuentra en la Universidad Católica de Louvain y fue registrada en el año 1894, puesto que la primera fue destruida durante la segunda guerra mundial (Uruburu, 2003); Giraldo, Restrepo, & Sánchez, 2011). Es entonces como diversos estudios se han realizado

para evaluar el comportamiento y la estabilidad genética de los microorganismos que se encuentran en conservación en las colecciones. Algunas de las investigaciones reportadas se relacionan a continuación:

Crespo, *et al.*, (2000) realizaron un estudio donde compararon diferentes métodos de almacenamiento como la criopreservación a -80°C , la liofilización, y la conservación en agua destilada en diferentes medios de cultivo para encontrar un método adecuado que permitiera un almacenamiento prolongado de *Malassezia* spp. La congelación a -80°C fue el único método exitoso para mantener todas las especies.

De igual manera Gibson & Khoury, (2001), investigaron sobre el almacenamiento y la supervivencia de 97 especies (276 cepas) de bacterias a -70° y a -80°C . Cada cepa se subcultivó a intervalos regulares durante un período de 6 a 40 meses para verificar su viabilidad. Todas las cepas fueron viables después del último subcultivo, excepto las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* que demostraron ser no viables cuando se analizaron después de 12 meses. En estudio realizado por Xiuying Sun, *et al.*, (1995) se determinó la existencia de una proteína con actividad anticongelante en la rizobacteria *Pseudomonas putida* la cual le permitió sobrevivir bajo la exposición a temperaturas de congelación entre -20 y -50°C .

En general los estudios resaltan como los mejores métodos de conservación los que se basan en el empleo de bajas temperaturas, porque han permitido garantizar la viabilidad de los aislamientos así como el mantenimiento de las características esenciales de los microorganismos preservados.

En el presente trabajo se usaron los microorganismos clasificados en el dominio bacteria, del género *Gluconacetobacter* spp., los cuales fueron aislados de caña de azúcar en estudios previos (Restrepo, 2017). Con relación a estas bacterias endófitas, éstas tienen potencial como promotoras de crecimiento vegetal, en las cuales se incluyen mecanismos directos e indirectos, los cuales serán descritos en apartes posteriores.

3.2. Preservación de microorganismos

De acuerdo con Oca, *et al.*, (2008) el uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad. Para su estudio es necesario que sean viables, y una vez demostrada su importancia y posibles usos, deberán ser mantenidos y conservados en una colección de cultivos microbianos para garantizar su disponibilidad. De acuerdo con lo anterior, se infiere la importancia de las colecciones de cultivos, ya que son una parte importante de la ciencia de la microbiología y además son especialmente importantes en la industria. Las colecciones de cultivos mantenidas por establecimientos industriales generalmente son especializadas y almacenan principalmente aquellas utilizadas para sus procesos productivos (Okafor, 2007).

La importancia central de un microorganismo en un establecimiento microbiológico industrial a veces puede darse por sentado. Si bien una materia prima puede sustituirse con bastante facilidad, el uso de un organismo diferente de uno que ya existe puede implicar una experimentación extensa y la modificación de los procesos establecidos si se desean obtener los productos habituales. Por lo tanto, es importante que los organismos cuyos

potenciales genéticos permanezcan invariables estén constantemente disponibles. En otras palabras, el acervo genético de organismos con propiedades deseables debe preservarse y estar constantemente disponible (Okafor, 2007).

3.2.1. *Métodos de conservación*

Existen varios métodos usados actualmente para la conservación de microorganismos. Entre los métodos de conservación de microorganismos existe una gran cantidad de técnicas, de las cuales ninguna se indica exclusivamente para un microorganismo en particular, puesto que todos se comportan de manera diferente; de acuerdo con lo anterior el método usado debería basarse principalmente en resultados de investigación. Sin embargo, existen tres principios fundamentales para la implementación de las técnicas de preservación de microorganismos: (i) la reducción en la temperatura de crecimiento, (ii) la deshidratación o desecación del medio de crecimiento y (iii) la limitación de los nutrientes disponibles para el microorganismo. Estos principios se basan en la búsqueda de la reducción del metabolismo del microorganismo (Okafor, 2007).

Sushil, *et al.*, (2018) resaltan como métodos comunmente usados para la preservación de microorganismos la suspensión en agua o en una solución *buffer*, la criopreservación, el método del disco gelatinoso, la arenilla esterilizada, el secado en frío o liofilizado, la silica gel y la cubierta de aceite. Dentro de los métodos usados para el mantenimiento y conservación de las bacterias evaluadas en este trabajo se encuentran:

3.2.1.1. *Reducción de la temperatura de crecimiento*

Los organismos que crecen en agar adecuado a temperaturas de crecimiento normales alcanzan la fase estacionaria y comienzan a morir debido a la liberación de materiales tóxicos y al agotamiento de los nutrientes. Por lo tanto, los organismos cultivados con agar se refrigeran tan pronto como se logre un crecimiento adecuado para preservarlos. El congelador doméstico común alcanza una temperatura de aproximadamente -20°C . Los congeladores de laboratorio utilizados para biología molecular alcanzan temperaturas de trabajo entre -60°C y -80°C . Para efectos prácticos es posible almacenar microorganismos en cualquier tipo de congeladores profundos en forma de tapones de agar o en perlas de vidrio estériles recubiertas con el organismo a almacenar (Okafor, 2007).

3.2.1.2. *Criopreservación*

De acuerdo con Smith, *et al.*, (2008) la criopreservación generalmente implica un almacenamiento a temperaturas alrededor de -70°C e inferiores, que impiden las reacciones químicas de las células. Para lograr una suspensión adecuada del metabolismo hasta un punto donde no pueda ocurrir una reacción física o química, se requiere un almacenamiento a temperaturas inferiores a -139°C . Las bajas temperaturas detienen el movimiento del agua en la célula, protegen las proteínas y el ADN de la desnaturalización y daños.

De todas las técnicas de preservación de microorganismos muchos microbiólogos prefieren las de temperatura criogénicas (-80°C o -196°C) con una concentración de 10% al 15% de glicerol y/o del 5% al 10% de dimetilsulfóxido (Crespo, *et al.*, 2000). La criopreservación es descrita por autores como Rodríguez, *et al.*, (2010) como el mejor

método para la conservación de microorganismos, porque se detiene su crecimiento en un estado de anabiosis, lo cual evita causar su muerte y preserva la estabilidad genética que se requiere para usos posteriores.

Al usar bajas temperaturas sobre los microorganismos éstos llegan a un estado conocido como anabiosis, la cual es la capacidad de los organismos para reducir o detener de manera reversible su actividad vital. La anabiosis surge como una forma de adaptación evolutiva para la supervivencia y preservación en condiciones extremas. En otra definición la anabiosis es la capacidad de los microorganismos para reducir su vitalidad al máximo (Doneva & Donev, 2005).

3.3. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal y sus características

Las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas son las bacterias del suelo que habitan alrededor de la superficie de la raíz y están directa o indirectamente involucradas en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la producción y secreción de diversos productos químicos reguladores cerca de la rizosfera. Estas bacterias de vida libre o asociativas son también consideradas como Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) (Loredo-Osti, López Reyes, & Espinosa Victoria, 2004). Las características de promoción del crecimiento se basan en mecanismos directos e indirectos. En general, las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal facilitan el crecimiento de las plantas directamente, ya sea facilitando la consecución de los recursos indispensables para la vida como son el nitrógeno, el fósforo y minerales esenciales, o ayudando a la planta a regular o modular las fitohormonas. Un mecanismo indirecto pero comprobado de promoción de crecimiento vegetal es la disminución de los efectos negativos de varios patógenos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en las formas de agentes de control biológico (Ahemad & Kibret, 2014). En este mecanismo se producen sustancias que dañan o inhiben los patógenos sin afectar a las plantas. Los mecanismos usados por las bacterias en el control de patógenos van desde la producción de algunas sustancias como antibióticos, siendo éste quizás el mecanismo más poderoso contra los fitopatógenos.

3.3.1. Género *Gluconacetobacter* spp.

Gluconacetobacter spp. es un género de bacterias de forma elipsoidal o con forma de varilla recta o ligeramente curvas. Son organismos Gram negativos y aeróbicos obligados; el metabolismo es estrictamente respiratorio con oxígeno como el receptor terminal de electrones. Algunas cepas producen colonias gruesas que forman películas. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C, el pH óptimo es de 2,5 a 6,0. Las especies de *Gluconacetobacter* spp. se encuentran en el vinagre, el hongo del té, la caña de azúcar, el insecto harinoso, las flores y las frutas, y pueden causar infecciones en bebidas y licores. Se desconoce que este género tenga algún efecto patógeno en humanos y animales (Brenner, *et al.*, 2005)

El género *Gluconacetobacter* comprende diferentes especies de importancia agrícola e industrial (Restrepo, *et al.*, 2017). Adicionalmente es un género de especies bacterianas endófitas que se presenta predominantemente en plantas de propagación

vegetativa (Mehnaz, *et al.*, 2006). Entre las diversas especies microbianas utilizadas en la agricultura, *Gluconacetobacter*. spp es muy importante, porque tiene una larga historia de interrelación bacteriano-vegetal como un endófito simbiótico capaz de fijar nitrógeno atmosférico, además de estar asociado a una gran cantidad de plantas de importancia económica en el mundo (Chawla, *et al.*, 2017) (Rocafull, *et al.*, 2016).

3.3.2. *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Gluconacetobacter sacchari* como BPCV

G. diazotrophicus anteriormente conocida como *Acetobacter diazotrophicus* fue aislada originalmente de la planta de caña de azúcar. Después de observar sus características se notó que éstas eran similares al grupo de bacterias del ácido acético, pero el hecho de que el género *Acetobacter* no posee capacidad de fijación de nitrógeno llevó a buscar nuevas clasificaciones, pasando por *Saccharobacter nitrocaptans* y después *Acetobacter diazotrophicus*. Finalmente después de realizar pruebas de hibridación de ARN/ADN se le cambió el nombre y ahora se le conoce como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Chawla, *et al.*, 2017). Esta bacteria que es ahora de gran importancia agrícola se asocia a especies vegetales con altos contenidos de azúcares. Ello permite el incremento del nitrógeno disponible para la planta a partir del proceso de fijación biológica. El microorganismo libera al medio hasta el 50 % de este elemento químico transformado. Además, posibilita el incremento de los rendimientos por la producción de sustancias fisiológicamente activas (Rios, *et al.*, 2007).

Dentro de las características que convierten a *G. diazotrophicus* en una bacteria con gran potencial en la agricultura se encuentran funciones como controlador de fitopatógenos (*Colletortichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*) y de nematodos (*Meloidogyne incognita*) (Giraldo, 2010). También se han encontrado resultados favorables con el uso de *G. diazotrophicus* en la solubilización de fofosfos (Restrepo, *et al.*, 2017). En estudios recientes se ha demostrado la capacidad que tiene este microorganismo en la solubilización de metales pesados como el Zinc (Chawla, *et al.*, 2017), lo cual lo pone como una bacteria promisoría en el tratamiento de contaminaciones causadas por metales pesados y a su vez podría servir para el aprovechamiento de suelos no aptos por metales pesados. Adicionalmente, en un estudio llevado a cabo por De Oliveira, *et al.*, (2016) se encontró que esta bacteria diazotrófica tiene una respuesta positiva y diferencial al estrés osmótico causado por suelos salinos, es decir, existe un potencial como uso de inoculante en ambientes salinos.

Por otro lado se encuentra la bacteria *Gluconacetobacter sacchari*, microorganismo aislado del insecto rosado de la caña, *Saccharicoccus sacchari* y de la vaina de la hoja de caña de azúcar en Queensland al norte de Nueva Gales del Sur, Australia (Franke, *et al.*, 1999). Esta bacteria tiene una morfología elipsoidal o en forma de varilla, aproximadamente $0,7-0,9 \times 1,3-2,2$ nm, se presentan individualmente, en pares o en cadenas cortas, su movilización se da por medio de flagelos peritricos (Brenner, *et al.*, 2005).

G. sacchari no tiene una característica fenotípica exclusiva, sin embargo se puede distinguir de los demás miembros de bacterias de ácido acético por su capacidad de crecer en presencia de verde malaquita, el crecimiento en glucosa, su incapacidad para la fijación

de nitrógeno y la incapacidad para crecer con los ácidos L-asparagina amino, glicina, glutamina, treonina y triptófano cuando D-manitol se suministra como única fuente de carbono y energía (Franke, *et al.*, 1999). *G. sacchari* ha sido muy estudiada por su capacidad de producir membranas de celulosa bacteriana y por ser un endófito en la caña de azúcar, es decir, que vive dentro de la planta por lo menos durante parte de su ciclo de vida sin causar daños (Trovatti, *et al.*, 2011), (Restrepo, *et al.*, 2017).

3.3.3. Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es generalmente considerado como uno de los principales nutrientes limitantes en el crecimiento de las plantas (Franche, *et al.*, 2009). El nitrógeno es un elemento químico no metálico, que en condiciones normales aparece como un gas diatómico, incoloro e inodoro. El nitrógeno molecular está ampliamente distribuido en la naturaleza en forma sólida, disuelta y gaseosa, pero es en la atmósfera donde se encuentra el mayor potencial biológico de reserva de nitrógeno (García, 2011).

El proceso biológico responsable de la reducción del nitrógeno molecular en amoníaco se conoce como fijación de nitrógeno (Franche, *et al.*, 2009). La fijación del nitrógeno es la oxidación o reducción del nitrógeno para dar amonio u óxidos. Esta es la conversión del nitrógeno atmosférico a formas metabolizables, que puedan ser incorporadas por los seres vivos. Estas formas son el ion amonio (NH_4^+) o los iones nitrito (NO_2^-) o nitrato (NO_3^-). Otras sustancias como el dióxido de nitrógeno (NO_2) reaccionan fácilmente para originar algunas de las anteriores (García, 2011).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden entrar en las raíces desde la rizosfera, particularmente en la base de las raíces laterales emergentes, entre las células epidérmicas y a través de los pelos radiculares. En la rizosfera, los pelos radiculares en crecimiento desempeñan un papel importante en el reconocimiento simbiótico en cultivos de leguminosas. Las leguminosas noduladas en la endosimbiosis con rizobios se encuentran entre los sistemas de fijación de nitrógeno más destacados en la agricultura. La inoculación de no leguminosas, especialmente cereales, con varias bacterias diazotróficas no rizobiales se ha realizado con la expectativa de que se establezcan intercelularmente dentro del sistema radicular, fijando el nitrógeno endofíticamente y proporcionando nitrógeno combinado para una mayor producción de cultivos (Cocking, 2003).

Según Franche, *et al.*, (2009) una amplia diversidad de especies bacterianas fijadoras de nitrógeno que pertenecen a la mayoría de los filos del dominio de las bacterias tienen la capacidad de colonizar la rizosfera e interactuar con las plantas. Las plantas leguminosas y actinorrizales pueden obtener su nitrógeno por asociación con rizobios o Frankia a través de la diferenciación en sus respectivas plantas huésped de un órgano especializado, el nódulo de la raíz. Otras asociaciones simbióticas involucran cianobacterias heterocistasas, mientras que un número creciente de especies fijadoras de nitrógeno se han identificado como colonizadoras de la superficie de la raíz y, en algunos casos, el interior de la raíz de una variedad de cultivos de cereales y pastos.

3.3.4. Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los elementos más importante para la producción agropecuaria, debido a su relativa escasez edáfica, la elevada retención por parte de la matriz del suelo, la falta de reposición natural y la progresiva escasez de sus fuentes naturales (Rubio, 2002).

Las plantas toman el fósforo de la solución del suelo como anión fosfato. Es el elemento menos móvil en plantas y suelos, diferente de otros macronutrientes. Precipita en el suelo como ortofosfato o es adsorbido por los óxidos de Fe y Al. Las bacterias solubilizadoras de fosfato desempeñan un papel en la nutrición del fósforo al mejorar su disponibilidad para las plantas a través de la liberación de reservas de P inorgánico y orgánico del suelo mediante solubilización y mineralización. El principal mecanismo en el suelo para la solubilización de fosfato mineral es la disminución del pH del suelo por la producción microbiana de ácidos orgánicos y la mineralización de P orgánico por fosfatasas ácidas. El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato como inoculantes aumenta la captación de P. Estas bacterias también aumentan las posibilidades de utilizar rocas fosfáticas en la producción de cultivos. Se ha demostrado una mayor eficacia de las bacterias solubilizadoras de P a través de la co-inoculación con otras bacterias beneficiosas y las micorrizas (Kkan, *et al.*, 2009).

3.3.5. Producción de fitohormonas

Las fitohormonas son moléculas orgánicas relativamente simples, como las auxinas y citoquininas, desempeñan un papel crucial en la provocación de la "totipotencia" en varios tipos de células vegetales y en la regulación de los procesos fisiológicos de las plantas. Estas están involucradas en varias etapas del crecimiento y desarrollo de la planta, tales como elongación celular, división celular, diferenciación tisular y dominancia apical (Costacurta & Vanderleyden, 1995).

La asociación de microorganismos y plantas sobre todo en la rizosfera es una de las fuentes más importantes para la estimulación y producción de fitohormonas usadas por las plantas. Diversos estudios han demostrado la biosíntesis y regulación de auxinas por microorganismos como las *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Aiospirillum* (Costacurta & Vanderleyden, 1995). Se ha descubierto también que nuevas cepas de microorganismos de la rizosfera como *Azotobacter chroococcum* Az d-10, *Bacillus megaterium* PI-04 y *Bacillus mucilaginosus* B-1574 pueden sintetizar citoquininas (CK) y ácido indolacético (AIA) (Sokolova, *et al.*, 2011). Los microorganismos pueden formar sustancias que incluyen ácido abscísico, etileno y otros compuestos con propiedades similares a las fitohormonas (brassinosteroides, oligosaccharinas) y análogos de los neurotransmisores animales (aminas biogénicas) (Tsavkelova *et al.*, 2006).

3.3.6. Inhibición de crecimiento de patógenos

La capacidad de las bacterias de control biológico para promover indirectamente el crecimiento de las plantas ha sido una fuente de gran interés, tanto en términos de desarrollar un entendimiento de algunos de los mecanismos subyacentes utilizados por las

bacterias de control biológico y de utilizar estas bacterias comercialmente en lugar de plaguicidas químicos (Glick., 2012).

Dentro de las capacidades indirectas de antagonismo para el control de patógenos se encuentran habilidades como la producción de antibióticos y enzimas líticas, también algunas cepas bacterianas tienen la capacidad de producir sideróforos. En este caso, los sideróforos de BPCV pueden evitar que algunos fitopatógenos adquieran una cantidad suficiente de hierro, lo que limita su capacidad para proliferar, esto sobre todo en los patógenos fúngicos, los cuales no pueden proliferar en la rizósfera de la planta huésped sin hierro. Otras herramientas usadas por las bacterias para el control de patógenos son la competencia por los espacios y los nutrientes, también se encuentra la producción de etileno, la cual es una hormona sintetizada por las plantas cuando hay presencia de patógenos, por lo tanto, para disminuir el daño de algunos patógenos como *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Erwinia carotovora*, entre otros, se tratan las raíces o semillas de las plantas con BPCV. Por último las BPCV pueden desencadenar un fenómeno en las plantas conocido como resistencia sistémica inducida (RSI) que es fenotípicamente similar a la resistencia sistémica adquirida (RSA). Lo que se logra con esta inducción de resistencia es la activación de mecanismos de defensa en respuesta a la infección por algún agente infeccioso, plantas con RSI están preparadas para reaccionar con mayor rapidez y fortaleza al ataque de patógenos (Glick, 2012).

3.3.6.1. *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici*

Fusarium oxysporum es un hongo que se presenta principalmente como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado, denominado *forma especial (f sp.)*, según la planta hospedante u hospedantes relacionados que afecte. Este es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (De Granada, *Et al.*, 2001).

El marchitamiento ocasionado por *Fusarium* es conocido como una de las enfermedades más devastadoras para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Esta enfermedad es ocasionada por la forma especial de *Fusarium oxysporum* denominada como *F. sp lycopersici* (Mes, *et al.*, 1999). Este hongo es responsable de pérdidas de hasta un 60% en los rendimientos del cultivo, también afecta la calidad del fruto y cuando la planta se marchita la pérdida puede llegar al 100%, ya que las plantas enfermas no crecen y sus frutos se maduran prematuramente (Marín, *et al.*, 2014).

El control de este hongo se fundamenta básicamente en tres estrategias: prácticas de manejo como la solarización de los suelos, eliminación de plantas afectadas, aplicación de fungicidas y el uso de variedades de plantas resistentes (Marín, *et al.*, 2014). Sin embargo, se sabe que las bacterias promotoras de crecimiento vegetal tienen la capacidad de actuar como antagonistas frente a algunos patógenos, las características de antagonismo son de manera indirecta, por ejemplo para hongos como es el caso de *Fusarium* las BPCV producen sideróforos, los cuales pueden evitar que algunos fitopatógenos adquieran una cantidad suficiente de hierro, esto limita su capacidad para proliferar en la rizosfera de la planta (Glick., 2012). En un estudio llevado a cabo por Logeshwarn, *et al.*, (2011), se evaluó el potencial de biocontrol de *G. diazotrophicus* en condiciones *in vitro* con *Fusarium oxysporum*. Los posibles compuestos implicados en el control biológico incluyen

2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y pioluteorina. El análisis por cromatografía en capa fina reveló que *G. diazotrophicus* produjo el antibiótico, Pyoluteorin, que ayudó en la supresión de patógenos transmitidos por el suelo. Los compuestos volátiles de *G. diazotrophicus* también inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*.

4. Materiales y métodos

4.1. Tipo de estudio

El proyecto es un estudio con un enfoque cuantitativo, el alcance de la investigación es correlacional, y el tipo de investigación es aplicada.

4.2. Ubicación

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Católica de Manizales, Caldas.

4.3. Aislamientos del estudio

Se evaluaron los aislamientos de la bacteria *Gluconacetobacter sacchari* identificados con los códigos GIBI014 y GIBI031, así como el aislamiento *G. diazotrophicus* GIBI029. Los aislamientos han sido preservados mediante criopreservación a -80°C, durante 4 años.

4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa R 3.5.2 y usándolo a través de RStudio en su versión 1.0.143. Para desarrollar los análisis se utilizaron los paquetes *Agricolae* el cual se usa para realizar las pruebas de normalidad tales como histogramas, qqplot, y shapiro-wilk, así como las pruebas de análisis de varianza (paramétrica), el Kruskal-Wallis (no paramétrica), y las pruebas post-hoc de Duncan (paramétrica). También se usó el paquete *performance analytics* y *facto mine* R para el análisis multivariado no supervisado como el análisis de componentes principales.

Inicialmente se realizaron pruebas de normalidad, histogramas, qqplot y shapiro-wilk, y dependiendo de los resultados arrojados se tomó la decisión de realizar pruebas paramétricas o no paramétricas. Después de realizar las pruebas se procedió a efectuar la comparación de las medias para cada variable. Para realizar el análisis de los componentes principales los valores fueron normalizados.

4.5. Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo a partir de un cultivo previo de la cepa patrón de *Gluconacetobacter diazotrophicus* ATCC49037, y de los aislamientos GIBI014, GIBI029, GIBI031, los cuales tenían una incubación de 4 días a 30°C en agitación constante a 150 rpm en caldo DYGS (pH 6,5). Los cultivos se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 minutos y seguidamente se retiró el sobrenadante. A la biomasa obtenida se le adicionó solución salina al 0,85% hasta completar 11 mL, se centrifugó nuevamente a 3.500 rpm durante 15 min y se retiró el sobrenadante completando así el primer lavado; enseguida se realizó un segundo lavado de la misma manera descrita anteriormente. Posteriormente se resuspendió la biomasa de las bacterias con 9 mL de solución salina al 0,85% y se

procedieron a realizar las mediciones en el espectrofotómetro para determinar la Densidad Óptica (DO) de la suspensión a una absorbancia 640 nm. El inóculo se preparó con una densidad óptica comprendida entre 0,9 y 1 (aproximadamente 10^8 células/mL).

4.6. Evaluación de la capacidad de solubilización de fofafos

La evaluación de la solubilización de fosfato se realizó en el medio NBRIP con tres fuentes de fosfato (tricálcico, de aluminio y de hierro) de manera individual, a través de la inoculación de tres gotas equidistantes de 20 μ L cada una (por microorganismo y por medio de cultivo), a partir del inóculo de la bacteria. Se utilizó como control un medio de cada fuente de fosfato, sin inocular. Las cajas se incubaron durante 7 días a temperatura de 37 °C. Al cabo de la incubación, se evaluó la capacidad de solubilización en la cual se determinó el diámetro de las colonias y el diámetro de los halos de solubilización, con el fin de calcular el índice de solubilización (A/B) (Kumar y Narula, 1999) y el porcentaje de eficiencia de solubilización $((A-B)/B*100)$ (Nguyen et al., 1992) (Figura 1).

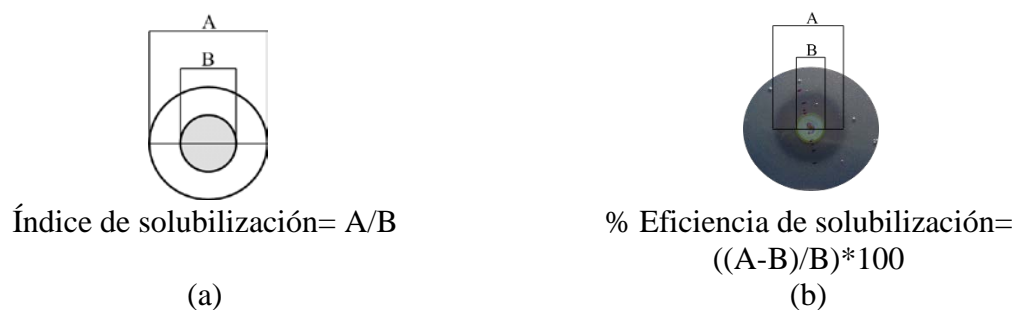


Figura 1. Determinación del diámetro de la colonia (B) y del halo de solubilización (A). (a) Esquema. (b) Fotografía de imagen real. Tomado de Restrepo, et al., (2015).

4.7. Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA)

Se tomaron 20 μ L del inóculo y se adicionaron a 5 mL de caldo DYGS suplementado con 50 μ L de solución de L- triptófano (1,01%). Los tubos se cubrieron con papel aluminio para evitar la degradación del L- triptófano; enseguida se colocaron los tubos nuevamente en agitación a 150 rpm, a 30 °C durante 168 horas. Posteriormente se procedió a separar la biomasa microbiana mediante centrifugación a 3.500 rpm durante 30 minutos, se tomaron 1,5 mL del sobrenadante y se le adicionó 1 ml de reactivo de Salkowski (ácido hiperclórico HCl_4 (36,5%): 98 mL; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,5M): 2 mL). Finalmente se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se realizó la lectura a 550 nm en un espectrofotómetro. Cada muestra se procesó por triplicado. Los niveles de compuestos indólicos se estimaron a partir de una curva patrón de 150 ppm de ácido indolacético (MERCK®, EUA) y se expresaron en μ g/mL.

4.8. Determinación de las propiedades de inhibición de crecimiento

4.8.1. Pruebas duales

En el centro de la placa de Petri que contenía el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD), se inoculó un disco de 5mm con micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Posteriormente, se sembró la bacteria (a partir de los inóculos inicialmente preparados para cada aislamiento) por estría recta y paralela a lado y lado del hongo (aproximadamente 2 cm de distancia).

Los cultivos se incubaron a 37°C hasta 12 días, realizándose lecturas a los 7 y 12 días, en los cuales se realizó la medición del radio de crecimiento del hongo (R2), con el cual se calculó el Índice de Eficacia Inhibitoria (IEI) (Asha et al., 2011) (Ecuación 1). Como control se empleó una placa de Petri con inoculación del hongo en el medio, en ausencia de BPCV, en el cual se determinó el radio de crecimiento de Fol (R1).

$$IEI = 100 - \left(100 \frac{R2}{R1}\right) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Los mejores aislamientos se seleccionan con base en un IEI superior al 70%, frente a *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*.

4.8.2. Interacción bacteria-hongo a través de compuestos volátiles orgánicos

A partir del inóculo de cada aislamiento de *G. diazotrophicus*, se realizó la siembra en superficie (100 µL) en una placa de APD. La tapa de la placa de Petri se reemplazó por una placa base que contenía APD, a la cual se le inoculó en el centro un tapón de agar de 0,1 mm de diámetro con crecimiento del micelio de Fol. Las bases de las dos placas de Petri se unieron y se sellaron con Parafilm. Los controles estuvieron constituidos por el montaje sin las bacterias en estudio, en la placa inferior. A los controles se les determinó el radio obtenido de Fol (R1). Las placas se incubaron por 8 días a 37°C y se determinó el diámetro de la colonia de Fol (R2). La medición del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (%ICM) se calculó de acuerdo con lo descrito en la Ecuación 2 (Gamliel et al., 1989).

$$\%ICM = 100 - \left(\frac{R2}{R1}\right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Después del tiempo de incubación, se retiró el tapón de agar que contenía el hongo Fol, y se colocó en placas de APD frescas. La viabilidad del cultivo fúngico transferido se registró después de 4 días.

5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos

En este estudio la capacidad de solubilización de fosfato de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal se evaluó utilizando tres fuentes de fósforo: fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y fosfato de hierro sobre medio NBRIP. Las cajas se incubaron durante 7 días a temperatura de 37 °C. Al cabo de la incubación, se evaluó la capacidad de solubilización en la cual se determinó el diámetro de las colonias y el diámetro de los halos de solubilización, con el fin de calcular el índice de solubilización.

5.1.1. Fosfato tricálcico

En esta evaluación se apreciaron halos de solubilización de la fuente de fosfato bien definidos (Figura 2). Las características macroscópicas de los aislamientos evaluados en el 2018, presentaron colonias circulares de borde regular, convexas, pequeñas, cremosas, brillantes de color verdoso (debido al colorante del medio de cultivo) y con un halo translúcido alrededor que indica la solubilización del fosfato tricálcico.

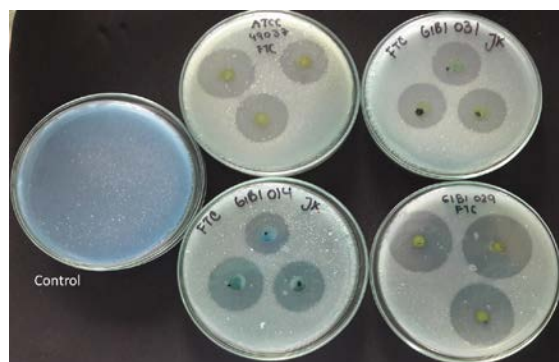


Figura 2. Halos de solubilización obtenidos con la fuente de fosfato tricálcico, empleando el medio NBRIP.

En la tabla 2 y figura 3 se pueden observar las diferencias estadísticas obtenidas en esta característica, entre las cepas y entre los datos obtenidos en los años 2014 y 2018 de evaluación, siendo el 2018 el año en el que se obtuvieron los mejores valores para el índice de solubilización de Ca_3PO_4 con la cepa GIBI014 (4,6). Cuando se hizo la comparación entre cepas para cada uno de los años no se encontraron diferencias significativas. Los valores de índice de solubilización reportados concuerdan con los valores observados por Restrepo, et al., (2017) en la evaluación de las propiedades de promoción de crecimiento de *G. diazotrophicus* y *G. sacchari* aisladas de caña de azúcar y tomate; en dicho estudio se reportaron valores similares para la cepa patrón ATCC49037 con un IS de 3,0, la cepa GIBI029 tuvo el valor más alto en el estudio anteriormente citado, con una media para IS de 3,6, cuyo valor es muy similar al encontrado en el presente estudio (3,7 en el año 2018). De acuerdo con Bashan, et al., (2013) las fuentes de fosfato tricálcico comúnmente usadas en este tipo de estudios son relativamente débiles en la solubilización y poco confiables como único factor de selección de BPCV, existe la probabilidad de que la fuente usada

haya influido en los valores reportados, los cuales indican que en el año 2018 hubo un incremento general y considerable para el IS con respecto al año 2014, estos datos podrían ser considerados como atípicos y por lo tanto este rendimiento debe ser confirmado a través de la evaluación de la solubilización de fosfato tricálcico empleando un medio líquido, Bashan, *et al.*, (2013) presenta una manera práctica en la determinación de BPCV mediante el uso de dos o tres compuestos de fósforo mezclados, teniendo en cuenta sobre todo el uso y el tipo de suelos en los que se desempeñaran las bacterias, por ejemplo compuestos de Ca-P (incluidos los fosfatos de roca) para suelos alcalinos, Fe-P y Al-P para suelos ácidos y fitatos para suelos ricos en fósforo orgánico, deben ser aisladas entonces las bacterias que presenten abundante producción de ácidos.

Tabla 1. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico, de los aislamientos preservados entre los años 2014 y 2018.

Cepa	Año	Grupo	Ca ₃ PO ₄ (IS)	Desv. estándar	Min	Max
GIBI014	2018	a	4,671856	0,84879442	3,2	6,1
GIBI031	2018	a	4,335832	1,10756025	2,8	6,6
ATCC49037	2018	ab	4,296688	1,10109956	2,8	6,2
GIBI029	2018	b	3,778047	0,71034431	2,5	5,1
ATCC49037	2014	c	2,430000	0,14000000	2,2	2,5
GIBI029	2014	c	2,213333	0,25794056	2,0	2,5
GIBI031	2014	c	2,043333	0,07505553	2,0	2,1

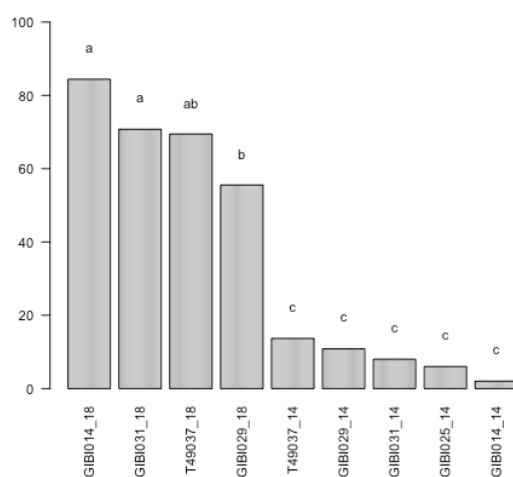


Figura 3. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05).

5.1.2. Fosfato de hierro

Las características macroscópicas que se observaron para los aislamientos de *Gluconacetobacter* spp., evaluados en el medio NBRIP suplementado con fosfato de hierro fueron las siguientes: colonias cremosas y lisas de borde regular, convexas, con un tamaño

mediano, brillantes, circulares, de color verde oscuro con un halo de cambio de color alrededor (Figura 4).

Con las cepas evaluadas en el año 2018 no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para el índice de solubilización de FePO_4 con respecto a la cepa patrón ATCC49037 (Tabla 3 y Figura 5). Sin embargo, se pueden notar algunas diferencias en los valores de las medias, los cuales son más altos para la cepa patrón ATCC49037 seguido por la cepa GIBI031; el índice de solubilización más bajo se obtuvo con la cepa GIBI029.

Delaporte, *et al.*, (2016) reportaron la solubilización de fuentes insolubles de fosfato con diferentes cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, entre ellas la cepa ATCC49037, la cual tuvo una media para IS de 1,2 un poco por debajo de lo encontrado en este estudio con un valor de 3,8. Tal parece que la criopreservación tiene efectos positivos para la conservación de la capacidad de solubilización de fosfato de hierro, sin embargo de igual forma que con el fosfato tricálcico es necesario corroborar los valores reportados en el presente estudio realizando solubilización en un medio líquido.

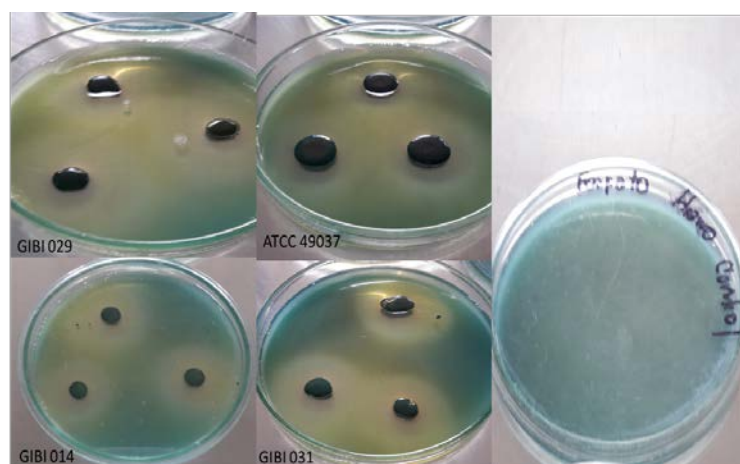


Figura 4. Halos de solubilización obtenidos con la fuente de fosfato de hierro, empleando el medio NBRIP.

Tabla 2. Análisis de varianza (0,05) para el índice de solubilización (IS) de fosfato de hierro, de los aislamientos preservados entre los años 2014 y 2018.

Cepa	Grupo	FePO_4 (IS)	Desv. estándar	Mín	Max
GIBI014	b	3,370738	0,7011087	2,3	5,1
GIBI029	c	2,842415	0,8261817	1,6	4,6
GIBI031	ab	3,604127	0,8293576	2,1	5,3
ATCC49037	a	3,871705	0,8408886	2,4	5,6

Mean Square Error: 0,6341121

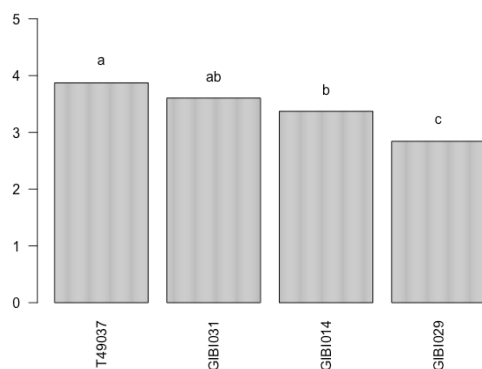


Figura 5. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico. Análisis de varianza (0,05).

5.1.3. Fosfato de aluminio

En la Figura 6 se pueden observar las características macroscópicas en el medio NBRIP con fosfato de aluminio como fuente de fosfato, se obtuvieron colonias cremosas y lisas de borde regular, convexas, con un tamaño pequeño, brillantes, circulares, de color verde claro con un halo translúcido alrededor.

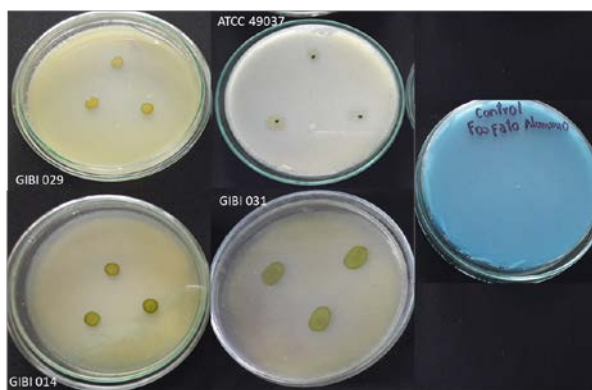


Figura 6. Halos de solubilización obtenidos con la fuente de fosfato de aluminio, empleando el medio NBRIP.

Sunthongwises, *et al.*, (2012) han referenciado en su estudio sobre aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato a *Gluconacetobacter* spp. como el único microorganismo que fue capaz de solubilizar formas insolubles de fosfato como $AlPO_4$.

Para realizar la comparación entre las cepas de *Gluconacetobacter* spp. y el efecto que tuvo la criopreservación a través del tiempo sobre la solubilización de $AlPO_4$, se contó con los datos de evaluación de los años 2014, 2016 y 2018. En la tabla 3 y figura 7 se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas del comportamiento de las cepas para el IS entre los diferentes años. El aislamiento GIBI029 se comportó de una forma similar en los años 2014 y 2016 con valores medios para el IS de 9,1 y 7,2

respectivamente, datos que son muy diferentes con respecto al año 2018 en donde la media para IS es muy inferior con 2,2.

La cepa GIBI031 tuvo el mismo comportamiento para el IS en los años 2014 y 2018 con valores medios de 7,4 y 7,2 respectivamente, este comportamiento cambió en comparación con el año 2018, en el cual se disminuyó considerablemente el IS con un valor medio de 2,5. Con la cepa GIBI014 no se muestran diferencias con respecto a los años 2014 y 2016, sin embargo, cuando se compara con el año 2018 se pudo ver una tendencia a la disminución para el IS con una media de 2,4. En cuanto a la cepa patrón comercial esta fue evaluada en los años 2016 y 2018, en los cuales se pueden observar diferencias estadísticas en sus valores medios de IS, siendo estos inferiores en el año 2018 con un IS de 2,8. En general la disminución en el tiempo de los índices de solubilización de las cepas dejan ver que la criopreservación podría no tener efectos positivos para la conservación de la capacidad de solubilizadora de fuentes insolubles de fosfato como el AlPO_4 , se deben realizar más análisis en los siguientes años con la finalidad de determinar un tiempo máximo de criopreservación sin afectar definitivamente esta característica.

Tabla 3. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de solubilización (IS) de fosfato de aluminio, de los aislamientos preservados entre los años 2014 y 2018.

Cepa	Año	Grupo	AlPO_4 (IS)	Desv. estándar	Min	Max
GIBI029	2016	a	9,135026	2,2151646	5,0	11,6
GIBI031	2014	ab	7,476667	0,5946708	6,8	8,0
GIBI029	2014	ab	7,243333	1,0562355	6,3	8,4
GIBI031	2016	b	7,271206	4,2203671	3,8	19,0
GIBI014	2014	b	6,043333	0,6986654	5,2	6,6
ATCC49037	2014	b	5,276667	0,2542309	5,0	5,5
GIBI014	2016	b	5,839819	4,0265086	1,1	16,9
ATCC49037	2018	c	2,866077	0,8392733	1,5	5,0
GIBI031	2018	cd	2,503598	0,3177818	2,0	3,0
GIBI014	2018	cd	2,411582	0,2908696	1,8	3,0
GIBI029	2018	d	2,235698	0,2700271	1,7	2,8

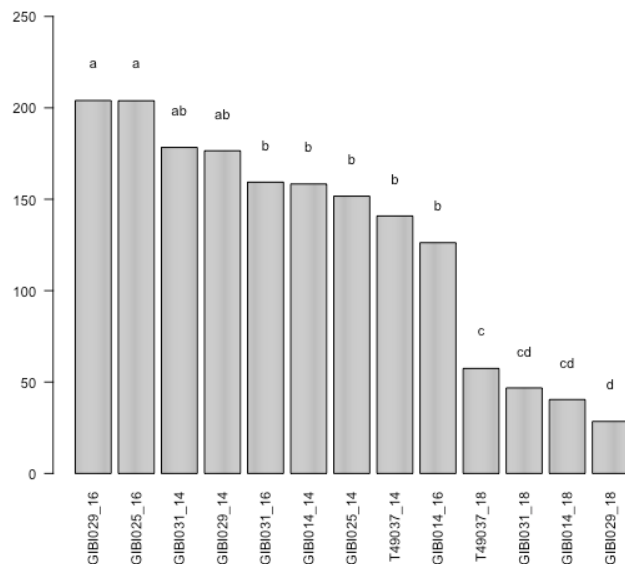


Figura 7. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de solubilización (IS) de fosfato de aluminio. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05).

5.2. Determinación de ácido indolacético

La tabla 4 y figura 8 muestra los valores promedio de la producción de ácido indolacético para las cepas evaluadas en los años 2014 y 2018. En ésta se puede observar que no se encuentran diferencias representativas entre las cepas y cada uno de los años. Sin embargo, cuando se hace la comparación entre años y cepas si se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas entre algunas bacterias. Es así como GIBI014 tuvo una media de 304,7 mg/mL en el año 2018, la cual es muy diferente a la media reportada en el año 2014 que fue del orden de 48,2 mg/mL. La cepa GIBI031 en la evaluación del año 2018 tuvo diferencias con la misma cepa evaluada en el año 2014 con valores de sus medias de 270,2 mg/mL y 46,6 mg/mL respectivamente. La cepas GIBI029 y patrón no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los años comparados.

Los valores de producción de AIA obtenidos en el 2018, concuerdan con valores similares encontrados por Mehnaz & Lazarovits, (2006) en un estudio en el que aislaron bacterias en la rizosfera de maíz con la finalidad de analizar la capacidad en la promoción de crecimiento de esta planta. En dicho estudio se reportó la cepa DS1 de *G. azotocaptans* con una producción media de AIA de 106 mg/mL, igualmente se registró la cepa identificada como Wt de *G. diazotrophicus* con una producción de 122 mg/mL de AIA y finalmente la cepa nif D de *G. diazotrophicus* con una media de 47 mg/mL de AIA. El incremento de los niveles de producción de AIA entre los años 2014 y 2018 podría ser considerado como un comportamiento atípico y por lo tanto es necesario continuar realizando seguimiento a las cepas de *Gluconacetobacter* spp. presentes en la colección para corroborar los datos reportados en el presente estudio, adicional sería bastante

interesante realizar pruebas de producción de AIA en plantas bajo condiciones controladas de invernadero.

Tabla 4. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para la producción de AIA de los aislamientos preservados y evaluados entre el 2014 y 2018.

Cepa	Año	Grupo	AIA (mg/mL)	Desv. estándar	Min	Max
GIBI014	2018	a	304,79627	212.439417	56,6	663,3
ATCC49037	2018	a	194,17127	105.709996	71,6	361,6
GIBI031	2018	a	270,28238	229.384240	3,3	531,6
GIBI029	2018	ab	121,67127	61.112374	61,6	186,6
GIBI029	2014	abc	78,54700	0.000000	78,5	78,5
ATCC49037	2014	dcd	64,28000	13.537433	78,0	57,4
GIBI014	2014	cd	48,28333	4.800003	43,4	53,0
GIBI031	2014	cd	46,61333	4.268562	42,4	50,9

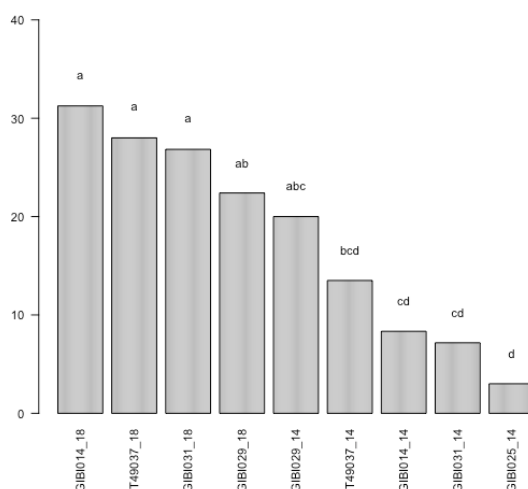


Figura 8. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014, 2016 y 2018, en la variable producción de AIA. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05).

5.3. Determinación de propiedades de inhibición de crecimiento

5.3.1. Pruebas duales

En el índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol no se encontraron diferencias estadísticas representativas entre las cepas y tampoco entre las cepas en función de los años evaluados (2014 y 2018) (Tabla 6). Se puede resaltar que la cepa GIBI014 fue la que mejor comportamiento mostró para inhibir el crecimiento del hongo con una media para IEI de 43,9 en el año 2018, la cual se encuentra por encima de la cepa patrón comercial ATCC49037 con un IEI de 36,2. En el año 2014 la cepa GIBI014 también presentó el mejor comportamiento con una media para IEI de 35,7. Esto demuestra el potencial que tienen las cepas de *Gluconacetobacter* spp. conservadas en criopreservación en la colección de microorganismos de la UCM. Los valores reportados en este estudio concuerdan con los

encontrados por Logeshwarn, et al., (2011) en un estudio para evaluar el potencial antagonico de *G. diazotrophicus* sobre *Fusarium oxysporum* en la papa; en dicho estudio se reportó la cepa PAL5 (ATCC49037) con un valor de EIE de 43,48, también hay reporte para la cepa L5 de la bacteria *G. diazotrophicus* con un valor medio para IEI 53,4. Esto da indicios de que las cepas mantenidas en criopreservación pueden conservar las características para el control de hongos fitopatógenos.

Tabla 5. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol en los años 2014 y 2018.

Cepa	Año	Grupo	IEI	Desv. estándar	Min	Max
GIBI014	2018	a	43,95604	5,814838	53,8	38,4
GIBI029	2018	ab	43,58974	10,509693	23,0	53,8
GIBI031	2018	abc	41,02564	12,561486	23,0	53,8
ATCC49037	2018	abcd	36,26374	17,035921	7,6	53,8
GIBI014	2014	abcd	35,77833	3,849090	32,2	42,2
GIBI029	2014	bcd	33,43500	1,421981	32,2	36,2
GIBI031	2014	d	30,61833	2,382901	27,7	33,3

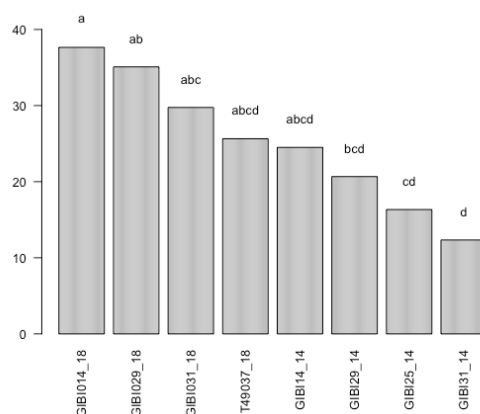


Figura 9. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos entre los años 2014 y 2018, en la variable índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05)

5.3.2. Interacción bacteria-hongo a través de compuestos volátiles orgánicos

De acuerdo con Hassan, et al., (2015) uno de los compuestos producidos por las BPCV más importantes para inhibir el crecimiento de hongos son los sideróforos. Este tipo de compuestos reducen la formación de micelio y las esporas germinativas. En el presente estudio el índice de eficiencia inhibitorio dado por los compuestos volátiles orgánicos frente a Fol no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7). Sin embargo, se pueden apreciar algunas diferencias observando las medias de IEI. La cepa patrón ATCC49037 fue la que tuvo un mejor IEI frente a Fol seguida de la cepa GIBI014, y por el contrario la cepa GIBI029 no demostró actividad antifúngica por este método. Contemplando estos resultados en relación con las pruebas duales se puede observar una buena referencia para determinar que existe un potencial en cuanto el antagonismo de *Gluconacetobacter* spp. frente a Fol después de estar conservadas sus cepas bajo

criopreservación a -80°C , sin embargo es necesario realizar pruebas de seguimiento para corroborar los datos obtenidos en esta investigación.

Tabla 6. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05) para el índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol de compuestos volátiles orgánicos, en el año 2018.

Cepa	Grupo	EIE	Error estándar	Min	Max
GIBI014	a	10.230352	10.081623	-8.40	18.69
GIBI029	b	-1.626016	12.544988	-21.9	18.69
GIBI031	ab	8.536585	6.272494	5.14	18.69
ATCC49037	a	11.924119	10.242940	-8.40	18.69

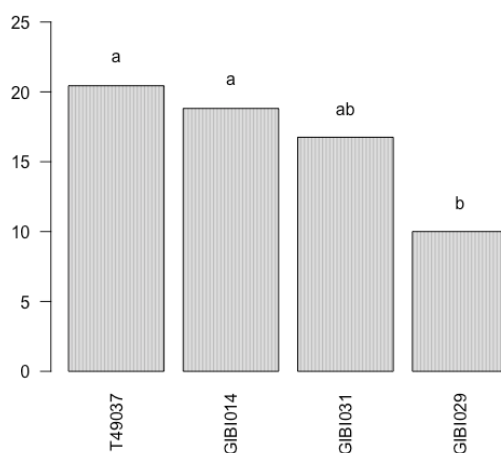


Figura 10. Diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas y los datos obtenidos en el año 2018, en la variable índice de eficiencia inhibitorio frente a Fol de compuestos volátiles orgánicos. Análisis no paramétrico, Krustal-Wallis (0,05)

5.4. Modelación del comportamiento de las variables

Se realizó una modelación con los datos obtenidos de todas las variables evaluadas en este estudio, con la finalidad de relacionar la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de las cepas de *Gluconacetobacter* spp. conservadas en criopreservación desde el año 2014. Para tal fin se realizó un análisis de componentes principales, el cual es un análisis multivariado no supervisado que permite reducir la dimensionalidad de los datos y observar la variabilidad de los mismos. Para realizar este análisis se normalizaron los datos con el fin de establecer si se puede realizar alguna clasificación de acuerdo al año o las cepas evaluadas, correlacionado también con el rendimiento de las diferentes variables estudiadas.

En la figura 11 se pueden observar las pruebas duales, la cantidad de AIA, la solubilización de fosfatos y los compuestos volátiles como las variables que mejor explican el comportamiento de las cepas de *Gluconacetobacter* spp. mantenidas en criopreservación.

El *heatmap* (figura 12) es la representación gráfica del comportamiento de las cepas de *Gluconacetobacter* spp., evaluadas en los años 2014, 2016 y 2018 en relación con las variables estudiadas. Los colores verdes claros explican la relación estrecha que existe entre las cepas, los años y la capacidad de promoción de crecimiento vegetal, es decir, esta gráfica permite observar que existe un comportamiento favorable para la capacidad de crecimiento vegetal en las cepas mantenidas en criopreservación en la colección de microorganismos de la UCM. El clúster (figura 13) agrupa conjuntos de cepas en los años evaluados con un comportamiento similar en todas las variables analizadas. Se pueden notar 4 subclúster demarcados sobre todo por los años analizados. En general el análisis de componentes principales y los tres tipos de gráficos nos indican que existe un cambio en el comportamiento de las cepas mantenidas en criopreservación y su capacidad de promoción de crecimiento vegetal a través del tiempo, en algunos casos como la producción de AIA y el antagonismo las propiedades son conservadas, para la capacidad de solubilización de fosfatos las cepas conservan sus propiedades aunque en el caso de AlPO_4 se va disminuyendo esta capacidad. Es necesario realizar pruebas anuales con la finalidad de disminuir la variabilidad de los datos y obtener un modelo más preciso para el comportamiento de las cepas mantenidas en criopreservación.

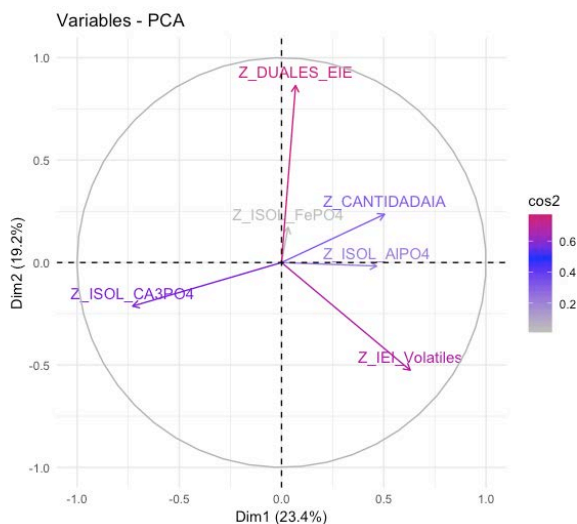


Figura 11. Análisis de los componentes principales para determinar el comportamiento general de la capacidad de crecimiento vegetal de *Gluconacetobacter* spp. mantenidas en criopreservación durante 4 años.

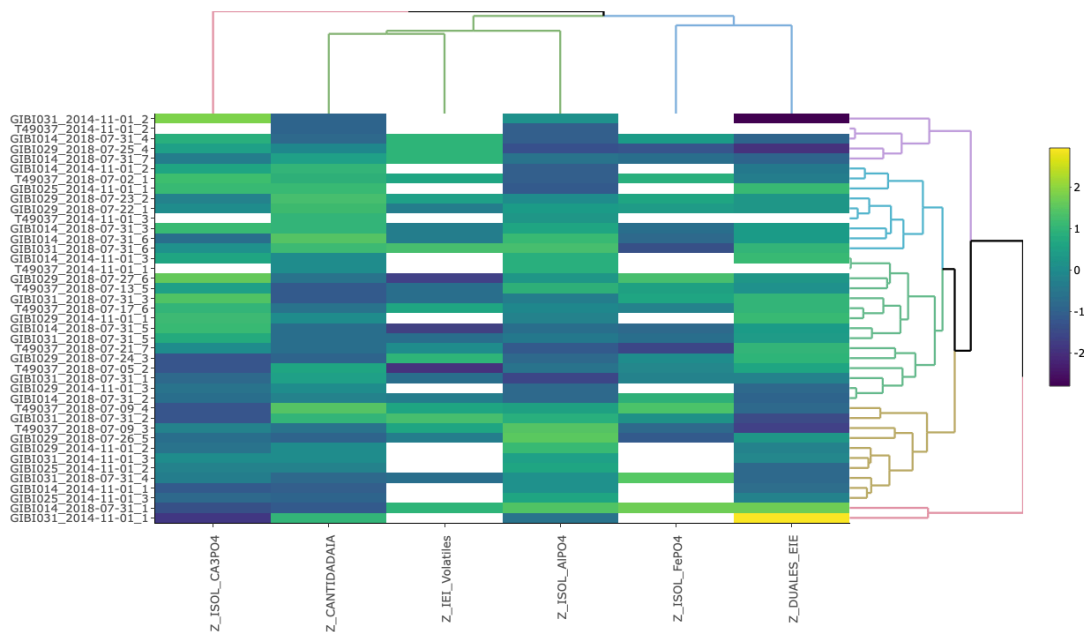


Figura 12. *Heatmap* que representa el comportamiento de las cepas de *Gluconacetobacter* spp. con respecto a su capacidad de promoción de crecimiento vegetal en el tiempo.

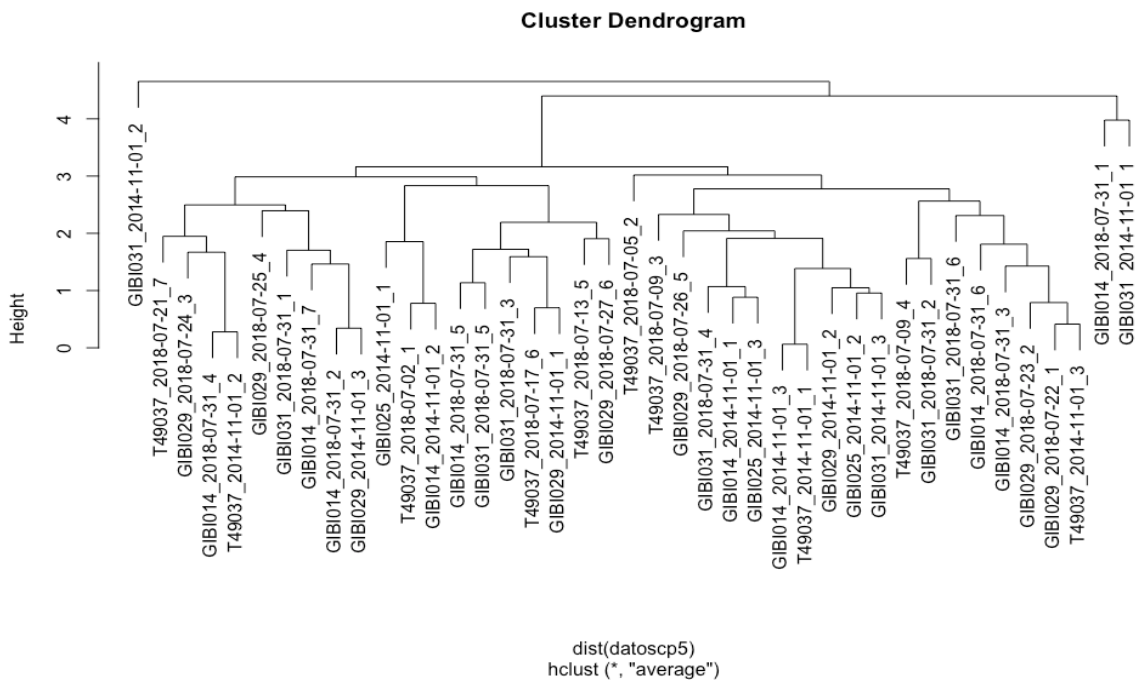


Figura 13. Dendrograma que muestra el análisis de agrupamiento de las cepas de *Gluconacetobacter* spp. conservadas en criopreservación con respecto al tiempo y la capacidad de promoción de crecimiento.

6. Conclusiones

- La capacidad de solubilización de fosfatos de las cepas de *Gluconacetobacter* spp. ha cambiado en algunos de los años evaluados. La solubilización de fosfato tricálcico incrementó en el 2018 con respecto al 2014. También se notaron diferencias para la solubilización de fosfato de aluminio entre los años 2016 y 2018, disminuyendo paulatinamente el índice de solubilización. Sin embargo, éste se encuentra en rangos aceptables con respecto a evaluaciones realizadas en otros estudios.
- La producción de AIA mostró diferencias significativas entre los datos obtenidos en el 2014 y 2018. Para el año 2018 se aumentó la producción de AIA con respecto al 2014, los valores reportados son similares a los encontrados en otros estudios realizados con *Gluconacetobacter* spp. Sin embargo, son datos atípicos con respecto a las evaluaciones de las mismas cepas evaluadas en la colección de microorganismos. Por lo tanto, es necesario realizar más pruebas para esta variable con la finalidad de corroborar los datos de este estudio.
- La característica de inhibición de crecimiento de patógenos específicamente contra *Fol* han sido conservadas en los años 2014 y 2018 evaluados. La cepa GIBI014 tuvo el mejor comportamiento para la inhibición del crecimiento del hongo filamentoso en los dos años. Esto indica que la criopreservación es una buena opción a la hora de conservar esta característica tan importante en las cepas evaluadas.
- Existe una gran variabilidad entre los datos analizados, sin embargo el análisis de componentes principales para modelar el comportamiento de las bacterias indica que la conservación mediante criopreservación puede ayudar de manera significativa a preservar las características de inhibición frente a patógenos como el *Fol*, a su vez también contribuye con la conservación de las características de solubilización de fosfatos.
- En algunas de las pruebas realizadas hubo disminuciones en los valores reportados por las bacterias a través del tiempo, sin embargo las características de promoción de crecimiento en general están siendo conservadas dentro de rangos admisibles; esto indica que el método de conservación por criopreservación es apto para almacenar las cepas de *Gluconacetobacter* spp. evaluadas en este estudio.

7. Recomendaciones

- De acuerdo con Bashan, *et al.*, (2013) las fuentes de fosfato usadas comunmente en los estudios para determinar la capacidad de solubilización de fosfato son relativamente débiles y poco confiables, parece que no hay un único compuesto de fósforo que se pueda usar como factor de selección universal de BPCV, los autores recomiendan usar una combinación de dos o tres compuestos de metal-P juntos o en tándem y se deben considerar las bacterias que presenten abundante producción de ácidos. Es necesario continuar realizando la evaluación de las pruebas de solubilización de fosfatos en medios líquidos para corroborar los datos arrojados en este estudio.
- Se recomienda realizar seguimiento a las pruebas para la producción de AIA con las cepas evaluadas, con la finalidad de corroborar los datos arrojados en este estudio e identificar su comportamiento (trazabilidad de los resultados).
- Se deben realizar pruebas al menos una vez cada año para evaluar la estabilidad de las características de promoción de crecimiento de las cepas de *Gluconacetobacter* spp. mantenidas en criopreservación en la colección de microorganismos de la UCM.
- Sería interesante realizar pruebas de campo en un cultivo de importancia agrícola con las cepas de *Gluconacetobacter* spp. mantenidas en criopreservación, ésto con la finalidad de aportar conocimiento acerca de su comportamiento bajo condiciones reales con pH de suelo cambiantes y condiciones climáticas y de cultivo reales.

8. Referencias bibliográficas

Asha, B.B., Chandra Nayaka, S., Udaya Shankar, A. C., Srinivas, C., Niranjana, S.R. (2011). Selection of effective bio - antagonistic bacteria for biological control of tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The bioscan. 6 (2): 239-244.

Bashan Y., Kamnev A.A., de-Bashan L.E. (2013). "Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure". Biology Fertility Soils 49: 465-479.

Beltrán S., Torrado Y., Martínez M., Matiz A. (2005). "Aislamiento de bacterias con actividad fosfato solubilizadora a partir de suelos ácidos del norte de Boyacá y producción de un inóculo mixto en fermentación discontinua", en Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. M. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*.

Caballero-Mellado, J. and E. Martínez-Romero (1994). "Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*." Applied and Environmental Microbiology 60(5): 1532-1537.

Castillo, G., B. Altuna, et al. (2005). "Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana." Anales de biología 27: 137-142.

Cavalcante, V. and J. Dobereiner (1988). "A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane." Plant Soil 108: 23-31.

Costacurta, A., Vanderleyden, J. (1995) Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria, Critical Reviews in Microbiology, 21:1, 1-18,

Delaporte-Quintana P, Grillo-Puertas M, Lovaisa NC, Rapisarda VA, Teixeira KR, Pedraza RO (2016) Solubilization of different sources of insoluble phosphate by *Gluconacetobacter Diazotrophicus*.

FAO (1995). Manual técnico de la fijación simbiótica de nitrógeno. Leguminosa/*Rhizobium*. Roma.

Gamliel, A., Kantan, J., Cohon, E. (1989). Toxicity of choronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. Phytoparasitica 17, 101–106.

Gordon S.A., Weber R.P. (1951). "Colorimetric estimation of indoleacetic acid". *Plant Physiology*, 26(1): 192-195.

Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, *Scientifica* vol. 2012, Article ID 963401.

Glickmann E., Dessaux Y. (1995). "A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2): 793-796.

Kumar V., Narula N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology Fertility Soils*, (28): 301- 305.

Madhaiyan, M., V. S. Saravanah, et al. (2004). "Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India." *Microbial Research* 159: 233-243.

Martínez, L., J. Caballero-Mellado, et al. (2003). "Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.)." *Plant and Soil* 257: 3 5-47.

Mes, J. J., Weststeijn, E. A., Herlaar, F., Lambalk, J. J. M., Wijbrandi, J., Haring, M. A., & Cornelissen, B. J. C. (1999). Biological and Molecular Characterization of *Fusarium* spp.

Mehnaz, S., & Lazarovits, G. (2006). Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. *Microbial Ecology*, 51(3), 326–335.

Moutia, J., G. Umrit, et al. (2003). "The role of diazotropic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cana in Mauritius: preliminary results." *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*: 29-39.

Muthukumarasamy, R., G. Rebathi, et al. (1999). "Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties." *Biol. Fertil. Soils* 29: 157-164.

Mes, J. J., Weststeijn, E. A., Herlaar, F., Lambalk, J. J. M., Wijbrandi, J., Haring, M. A., & Cornelissen, B. J. C. (1999). *Biological and Molecular Characterization of Fusarium oxysporum* sp. lycopersici Divides Race 1 Isolates into Separate Virulence Groups. *Phytopathology*, 89(2), 156–160.

Restrepo GM, Marulanda S, de la Fe Y, Díaz A, Baldani VL, Hernández-Rodríguez A (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica (Phosphate-solubilizing bacteria and their potential for use in promoting the growth of economically important crops, in Spanish). *Rev. CENIC, Cienc. Biol.* 46:63- 76.

Rodas, J. A., Quero, B. M., Magaña, S. F., Reyes, R. A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad quitino- proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XI (1), 107-113.

Rubio G. 2002. Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: 19:23.

Sarwar M., Kremer R.J. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 282-285.

Universidad Católica de Manizales. (2019). Colección de microorganismos de la UCM. <http://www.ucm.edu.co/instituto-de-investigacion-en-microbiologia-y-biotecnologia-agroindustrial/coleccion-de-microorganismos-de-la-ucm/>.

World Data Centre for Microorganisms. (2014). Culture collections information worldwide. <http://www.wfcc.info/ccinfo/>.

Wu, Yue-Jin, Chih-Yu Cheng, and Yaw-Kuen Li. (2009). Cloning and Expression of Chitinase A from *Serratia marcescens* for Large-Scale Preparation of N, N-Diacetyl Chitobiose. *Journal of the Chinese Chemical Society* 56.4: 688-695.