

## Bacteriología



**DETERMINACION DEL MEJOR MÉTODO DE CONSERVACIÓN PARA  
MANTENER LA ESTABILIDAD BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS *Bacillus subtilis*  
GIBI 200 y *Bacillus pumilus* GIBI206 ALMACENADAS EN LA COLECCIÓN DE  
MCROORGANISMOS DE LA "UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES "**

**ANNITA FERNANDA MENA GUERRERO**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA  
MANIZALES  
2018**

**DETERMINACION DEL MEJOR MÉTODO DE CONSERVACIÓN PARA  
MANTENER LA ESTABILIDAD BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS *Bacillus subtilis*  
GIBI 200 y *Bacillus pumilus* GIBI206 ALMACENADAS EN LA COLECCIÓN DE  
MCROORGANISMOS DE LA "UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES "**

**ANNITA FERNANDA MENA GUERRERO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:**

**BACTERIÓLOGA**

**Director:**

**NARMER FERNANDO GALEANO VANEGAS**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**BACTERIOLOGÍA**

**MANIZALES**

**2018**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Firma de director del Trabajo de Grado**

---

**Firma del presidente del Comité Académico**

---

**Firma de Evaluador**

## DEDICATORIA

A Dios, por inspirar mis pensamientos, además de su infinito amor y bondad.

A la memoria de mi madre Irene (01/SEP/1966 – 31/ENE/2018) por haber sido la mejor madre del mundo, por sus enseñanzas, su ejemplo y todo el amor que me brindó siempre, y que a pesar de que nunca nos volveremos a abrazar siempre está conmigo en cada momento incondicionalmente.

A mi papá Ricardo Guillermo por ser el papá más consentidor, por ser mi rey y mi héroe, por apoyarme siempre en todos mis sueños, por enseñarme con su ejemplo y sus consejos a ser una gran persona.

A mi hermana Natali por ser mi madre y mi guía, la razón de mi vida, mi inspiración y mi mayor orgullo, por sus consejos, regaños, por dibujar siempre una sonrisa en mi rostro, por enseñarme lo maravillosa que es la vida.

A mi abuelita Blanca por consentirme tanto desde niña, por ser mi amiga, cómplice, y una madre más, por creer en mí y por sentirse orgullosa de cada paso que doy.

A todos mis amigos y compañeros de la Universidad en especial a Estefanía Marín, Zaira Guerrero, Daniel Cañaverl y Yulieth Reyes, por cada sonrisa, por ser un apoyo siempre en este camino que juntos construimos.

A Angie Giraldo y Camila Noreña, por ser mis mejores amigas, por su apoyo incondicional en cada momento, por construir recuerdos inolvidables.

A Fernando Galeano por su ayuda incondicional como director en mi proyecto de investigación.

A la Universidad Católica de Manizales y a mis Maestros por sus consejos y por convertirse en un segundo hogar.

***“SOMOS ARQUITECTOS DE NUESTRO PROPIO DESTINO”***

***ALBERT EINSTEIN***

## AGRADECIMIENTOS

### **Instituciones y oficinas**

A la universidad, por la financiación de la tesis a través del proyecto: **DETERMINACIÓN DEL MEJOR MÉTODO DE CONSERVACIÓN PARA MANTENER LA ESTABILIDAD BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS *Bacillus subtilis* GIBI 200 y *Bacillus pumilus* GIBI206 ALMACENADAS EN LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA "UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES "**

### **Universidad Católica de Manizales:**

- Rectoría, Vicerrectoría Académica y Vicerrectoría Administrativa y Financiera
- Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, por el uso de los laboratorios y sus instalaciones para el desarrollo de la Tesis
- Grupo de Investigaciones Biológicas, al cual está inscrito el Semillero de Investigaciones Biotecnológicas (SIBIO) por el apoyo durante el desarrollo de la investigación

### **Doctores e investigadores**

- M. Sc Narmer Fernando Galeano, investigador de la Universidad Católica de Manizales, por su apoyo en la dirección del proyecto.
- M. Sc Marta Cecilia Ramírez, docente de la Universidad Católica de Manizales, por alentarme, brindarme su apoyo incondicional y orientación permanente en el proceso.
- M. Sc Mónica Quintero Moreno, investigadora, por su apoyo y orientación en el proceso.

### **Estudiantes de Pregrado y Compañeros**

- A Laura Ossa, Andrea López y Cristian Cuellar por su apoyo y acompañamiento en todo el proceso documental y experimental.

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. OBJETIVOS .....	17
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. REFERENTE TEÓRICO .....	18
3.1 ANTECEDENTES.....	18
3.2 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV).....	21
3.2.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITROGENO (N <sub>2</sub> ).....	23
3.2.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE FÓSFORO (P) .....	24
3.2.3 Bacillus subtilis y Bacillus pumilus COMO BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL .....	26
3.3 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN MICROBIANA .....	29
3.3.1 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO.....	30
3.3.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO.....	31
3.3.3 METODOS ALTERNATIVOS .....	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1 TIPO DE ESTUDIO.....	33
4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA .....	33
4.3 PROCEDIMIENTO .....	33
4.3.1 CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO: .....	34
4.4 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.....	35
4.4.1 CONSERVACIÓN POR CRIOPRESERVACIÓN .....	35
4.4.2 SUSPENSIÓN EN AGUA DESTILADA ESTÉRIL.....	36



4.4.3 DESECACIÓN EN DISCOS DE PAPEL FILTRO.....	36
4.4.4 ACEITE MINERAL.....	37
4.5 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS .....	38
4.6 EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFORO DE LOS MICROORGANISMOS.....	39
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	40
5. RESULTADOS .....	41
5.1 DENSIDADES ÓPTICAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	41
5.2 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA .....	41
5.3 DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS. ....	43
5.4 VIABILIDAD CELULAR DE LOS MICROORGANISMOS .....	43
5.4.1 VIABILIDAD CELULAR PARA EL MÉTODO ACEITE MINERAL .....	49
5.5 SOLUBILIZACIÓN DEL FÓSFORO.....	50
5.5.1 INDICES DE SOLUBILIZACIÓN DEL FÓSFORO .....	53
6. DISCUSIÓN .....	55
6.1 DENSIDAD ÓPTICA.....	55
6.2 DISCUSIÓN VIABILIDAD CELULAR.....	55
6.2.1 MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN.....	55
6.2.2 VIABILIDAD CELULAR EN MÉTODOS DE PRESERVACIÓN CON AGUA DESTILADA.....	57
6.2.3 VIABILIDAD CELULAR EN MÉTODOS DE PRESERVACIÓN CON PAPEL FILTRO .....	58
6.2.4 VIABILIDAD CELULAR EN MÉTODOS DE PRESERVACIÓN CON ACEITE MINERAL .....	59
6.3 SOLUBILIDAD DE FÓSFORO EN MÉTODOS DE CONSERVACIÓN. ....	60
7. CONCLUSIONES.....	64
8. RECOMENDACIONES .....	65

9. ANEXOS .....	66
ANEXO 4.....	73
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medición de la biomasa, resultados de densidad óptica GIBI200 y GIBI206	41
Tabla 2. Porcentajes de viabilidad en función del tiempo y el método de conservación CEPA GIBI206.	44
Tabla 3. Porcentajes de viabilidad en función del tiempo y el método de conservación CEPA GIBI200	44
Tabla 4. Índices de solubilidad del fósforo	53

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Equipos utilizados para la medición de la biomasa	35
Figura 2. Crioviales	36
Figura 3. Conservación en papel filtro	37
Figura 4. Conservación en aceite mineral	38
Figura 5. Características macroscópicas <i>Bacillus pumilus</i> GIBI206, <i>Bacillus subtilis</i> GIBI200.	42
Figura 6. Características microscópicas <i>Bacillus subtilis</i> GIBI200, <i>Bacillus pumilus</i> GIBI206.	43
Figura 7. Método de criopreservación CEPA GIBI200	45
Figura 8. Método de Agua destilada CEPA GIBI200	46
Figura 9. Método de Papel filtro CEPA GIBI200	46
Figura 10. Método de criopreservación CEPA GIBI206	47
Figura 11. Método de agua destilada CEPA GIBI206	47
Figura 12. Método de papel filtro CEPA GIBI206	48
Figura 13. Gráfica Unificada de resultados de viabilidad.	48
Figura 14. Cepas GIBI200 y GIBI 206 conservadas en aceite mineral y sus respectivos repiques en agar APD.	49
Figura 15. Aislamiento de la cepa GIBI206 conservada por el método de aceite mineral. Medio APD	49
Figura 16. Aislamiento de la cepa GIBI200 conservada por el método de aceite mineral. Medio APD.	50
Figura 17. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de criopreservación	51
Figura 18. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de aceite mineral.	51
Figura 19. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de papel filtro	52
Figura 20. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de agua destilada.	52
Figura 21. Porcentajes de Solubilidad del fósforo unificados.	53
Figura 22. Índices de solubilización unificados	54
Figura 23. Acción de las fosfatasas. Imagen Tomada de Plazas 2010	61

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág</b>
ANEXO 1. Datos generales correspondientes al conteo de colonias por cada método de conservación en las primeras 24 horas y por cada trimestre.	66
ANEXO 2. Resultados de estadística descriptiva para solubilización del fósforo.	71
ANEXO 3. Prueba de solubilización de fósforo en medio N-BRIP	72
ANEXO 4. Densidades ópticas	73
ANEXO 5. Pruebas Estadísticas	74

## 1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son un componente fundamental en la biodiversidad; intervienen en el reciclado de nutrientes, retención de carbono del suelo, ciclos biogeoquímicos, generación de oxígeno, la fotosíntesis, obtención de medicamentos, elaboración de alimentos como el pan, queso, licores y más; fabricación de solventes y reactivos e investigaciones en general, manteniendo la diversidad e integridad de los ecosistemas. (Olalder V. et.al 2014).

También los microorganismos tienen utilidad en la producción agrícola sustentable la cual, requiere de estrategias que aseguren un crecimiento sano de las plantas y una producción rentable; como es el caso del uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) que permiten mejorar o reducir las diversas formas de fertilización química al suelo, para que, el suelo, la planta, y el agricultor se beneficien. (Vibha y Neelam, 2012).

Cuando un microorganismo es mantenido por fuera de su ambiente natural es posible que las adaptaciones a estas nuevas condiciones determinen cambios en la viabilidad celular; como cambios genéticos que hacen que se reprima o cambien los genes debido a las mutaciones que modifican al microorganismo de manera fortuita, cambios en la actividad metabólica y por ende un deterioro en la actividad enzimática, alterando las cepas puras y la funcionalidad de estas e incluso la pérdida de la cepa, que hacen que estos microorganismos pierdan su calidad, perdiendo su importancia como promotores de crecimiento vegetal y otras características con uso potencial, aún sin identificar. (González H. y Fuentes N, 2017)

Sin embargo, hay metodos de conservación que hacen que los microorganismos conserven su estabilidad funcional en los diferentes ámbitos en los que se utilizan. “No obstante, no existe un metodo universal a largo plazo que mantenga una conservación adecuada por lo que se hace necesario la evaluación de los diferentes métodos de acuerdo a las particularidades de los microorganismos” (García y Uruburu, 2005) y las características de interes que se desea mantener; por tanto es fundamental garantizar la disponibilidad de las cepas para poder ser estudiadas y aprovechar su potencial.

Es escasa la información referente de la conservación y no se encuentran antecedentes sobre el impacto que puedan tener las diferentes metodologías sobre características metabólicas de las bacterias de interés, y también son escasos los productos biológicos que ayuden a la mejora de los cultivos de una manera competente con los productos químicos. (Castañeda E. y Sánchez L. 2016)

*Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*, juegan un papel importante en el control biológico de patógenos en plantas RPCV (Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) mejorando profundamente la germinación de semillas, desarrollo de la raíz y la utilización del agua por las plantas. Estas rizobacterias pueden estimular el crecimiento de plantas directamente por la producción de hormonas de crecimiento y mejorar la absorción de nutrientes o indirectamente cambiando el equilibrio microbiano en la rizosfera en favor de los microorganismos beneficiosos, ellos pueden suprimir un amplio espectro de infecciones bacterianas, fúngicas y enfermedades de nematodos. Las RPCV también puede proporcionar protección contra las enfermedades virales. (Öztürk S. et.al 2016)

El uso de RPCV se ha convertido en una práctica común en muchas regiones del mundo demostrando un control significativo de patógenos en plantas mediante estudios de laboratorio y de invernadero. Los recientes avances en nuestra comprensión de la diversidad, la capacidad de colonizar, mecanismos de acción, formulación y aplicación debe facilitar su desarrollo como agentes de control biológico fiable contra patógenos de plantas. Algunas de estas rizobacterias también se pueden utilizar en los programas de manejo integrado de plagas. Una mayor aplicación de RPCV es posible en la agricultura para el control biológico de patógenos de plantas y biofertilización. (Rekha K. et.al 2018)

Actualmente estos microorganismos están siendo utilizados en numerosos trabajos de laboratorio, principalmente en el área de investigación debido a su potencial uso en la biotecnología, la industria, y la clínica, por lo que es necesario aplicar un método de conservación que garantice la supervivencia de al menos el 70 % de los microorganismos por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original, conserve las propiedades de importancia, se minimicen la ocurrencia de alteraciones genéticas y se reduzca al mínimo el riesgo de contaminación, permitiendo así, que la pureza de las cepas permanezca inalterable. (Weng A et.al, 2005)

El Grupo de investigaciones biológicas GIBI de la Universidad Católica de Manizales ha venido trabajando en obtener aislamientos bacterianos de importancia para la producción de cultivos, y hasta ahora se ha logrado de una manera eficiente aislamientos puros que se encuentran almacenados en la Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales y por tanto se hace necesario explorar metodologías de conservación que garanticen la viabilidad de las cepas a largo plazo así como el mantenimiento de sus características de interés.



Por tanto, este trabajo pretende evaluar diferentes metodologías para la conservación de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*, explorando alternativas que garanticen su constante disponibilidad, mantenga las propiedades bioquímicas, que la hacen interesante permitiendo así conservar este recurso a largo plazo con el fin de mantenerlo disponible como soporte fundamental de investigaciones vigentes y futuras.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el mejor método de conservación que garantice la estabilidad bioquímica de *Bacillus subtilis* GIBI200 y *Bacillus pumilus* GIBI206 almacenados en la “Colección de microorganismos de la UCM”

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el porcentaje de viabilidad de *Bacillus subtilis* GIBI200 y *Bacillus pumilus* GIBI206 para evaluar la efectividad de cuatro métodos de conservación métodos durante 15 meses.
- Evaluar la estabilidad bioquímica de *Bacillus subtilis* GIBI200 y *Bacillus pumilus* GIBI206 mediante la prueba de solubilización de fosfato como bacterias promotoras de crecimiento vegetal mediante diferentes métodos de conservación, después del tiempo establecido.

### 3. REFERENTE TEÓRICO

#### 3.1 ANTECEDENTES

Fernández y colaboradores en el 2013, establecieron que las colecciones microbianas constituyen una herramienta de importancia para el progreso y desarrollo de diferentes ramas de la ciencia y de ahí la necesidad de mantener y disponer de cultivos microbianos de calidad mediante el uso de diferentes métodos de preservación que garanticen que el cultivo a conservar sea puro reduciendo al mínimo la posibilidad de contaminación que aseguren al menos la supervivencia del 70% de las células por un periodo determinado de tiempo. Cabe resaltar la importancia de mantener la estabilidad genética (García M. y Uruburu F, 2000).

Zdenek Hubálek en el 2003, estudió diferentes protectores utilizados en microorganismos, concluyendo que el efecto crioprotector de la sacarosa en concentraciones promedio del 10% en muestras congeladas a -10°C, garantizó una supervivencia a largo plazo de *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Proteus* y *Micrococcus spp.*

Otros autores como Chiellini, C. y colaboradores en el 2016 encontraron que la criopreservación es un método para almacenamiento a largo plazo de soluciones microbianas estándar de *Bacillus subtilis* para actividades microbiológicas de control de calidad de compañías farmacéuticas dando buenos resultados hasta un período de 14 meses.

Huertas y colaboradores en el 2006, compararon distintos métodos de conservación, papel filtro y criopreservación, en cepas de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, pertenecientes al banco de cepas y genes del Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) concluyendo que la criopreservación es el mejor método, con un porcentaje de recuperación mayor al 50 % a las 24 horas de conservado

Son pocas las investigaciones recientes reportadas para la conservación de la viabilidad genética y bioquímica de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*. Sin embargo, otros investigadores como Pérez J, *et al.*, (2011). Realizaron una investigación en una colección de microorganismos, se realizó el método de conservación en agua destilada estéril, el cual resultó ser muy fácil y económico, por lo que el objetivo del trabajo fue su utilización en la conservación de diferentes géneros bacterianos (como *Xanthomonas*, *Bradyrhizobium* y *Xynorhizobium*) a temperatura ambiente y refrigeración por un periodo de tiempo de 18 meses.

Como resultados obtuvieron que el método de agua destilada sea un método de mediano plazo y es más efectivo en temperaturas ambiente. Con el empleo de este método, las cepas bacterianas se mantienen puras y sin alteración morfológica, es decir en estado de hipobiosis y los géneros bacterianos de la Colección del Microorganismos del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) con mayor supervivencia fueron *Xanthomonas*, *Bradyrhizobium* y *Xynorhizobium* con un 80 % de viabilidad.

Vibha B, Neelam G (2012) realizaron un análisis de literario sobre la importancia de exploración de la biodiversidad microbiana por el hecho de que los microorganismos son esenciales para la vida ya que realizan numerosas funciones esenciales para la biosfera que incluyen el reciclaje de nutrientes y desintoxicación del ambiente. Además, los autores resaltan el uso de diferentes

métodos de conservación, entre los cuales podemos encontrar aceite mineral, criopreservación, agua destilada, liofilización, secado y conservación en nitrógeno líquido como técnicas para mantener la estabilidad y viabilidad genética de los microorganismos conservados.

Acenet I. y colaboradores (2011), evaluaron la actividad antagonista de dos cepas de *Bacillus subtilis* conservadas en discos de papel filtro a 4°C por un período de tres años, las cepas de *Bacillus subtilis* (Bs-21 y Bs-42) se mantuvieron viables por tres años en papel filtro a 4°C, y además mantuvieron su capacidad antagonista frente a la cepa Rs-10 de *Rhizoctonia solani*.

Las rizobacterias fueron nombradas por primera vez por Kloepper y Schroth en 1981, refiriéndose a las comunidades bacterianas del suelo que competitivamente colonizaban las raíces de las plantas y estimulaban su crecimiento, reduciendo de este modo la incidencia de enfermedades. Posteriormente, Gray y Smith en el 2005 estableció diferentes Géneros bacterianos como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* como bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Los mecanismos de biocontrol involucran múltiples interacciones que resultan en efectos positivos en el crecimiento y desarrollo vegetal (Jolles y Muzzarelli, 1999; Benítez et al., 2004; Gohel et al., 2006; Bhattacharya et al., 2007). La producción de fitohormonas que favorecen el crecimiento de las plantas representa una interacción indirecta entre el biocontrolador y el patógeno, mientras que la producción de enzimas líticas por biocontroladores, que afectarían negativamente el patógeno, ejemplifica una interacción directa biocontrolador-patógeno (Jollès y Muzzarelli, 1999; Benítez et al. 2004; Gohel et al., 2006; Bhattacharya et al., 2007; Spaepen et al., 2008).

*Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* pueden llegar a adsorber hasta 92,3 mg/g de Pb y hasta 20,8 mg/g de Cu (Tunali S. et.al 2006). Además, este tipo de bacterias se destacan por ser microorganismos solubilizadores de fosfato aislados en distintos tipos de suelo. (Chung et al. 2005). Los mismos investigadores aislaron bacterias solubilizadoras de suelos subtropicales y evaluaron su habilidad para solubilizar fosfato tricálcico encontrando aislados pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia* y *Phyllobacterium*. Oliviera y colaboradores en el 2008, aislaron, seleccionaron y evaluaron la actividad solubilizadora de microorganismos en rizósfera de maíz en suelos brasileros, con el fin de encontrar potenciales bioinoculantes; se seleccionaron los 45 mejores aislamientos que fueron identificados basándose en la secuencia de nucleótidos del 16S rDNA (ADN Ribosomal) para bacterias y actinomicetos y en el EIT (espaciador interno transcrito) rDNA para los hongos. Se identificaron los géneros *Bacillus* y *Burkholderia sp.*, como mejores bacterias solubilizadoras de fosfato, y *Aspergillus terreus* como mejor hongo solubilizador.

### **3.2 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV)**

Las BPCV son un grupo de microorganismos que favorece a las plantas a través de diferentes mecanismos que se pueden resumir en: la fijación biológica del nitrógeno, síntesis de fitohormonas como las auxinas -fundamentalmente el ácido indolacético AIA-, promoción del crecimiento de la raíz y proliferación de pelos radicales, mejora de la absorción de agua y nutrientes, solubilización los fosfatos di y tricálcicos e inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. (Torriente, D, 2010).

Los microorganismos promotores de crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el mantenimiento de la salud

radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos. (Matiru, V. N. y Dakora, F, 2004).

Diversos géneros bacterianos se han aislado de las plantas y el suelo rizosférico de arroz, y se han realizado estudios al respecto como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia* y *Gluconacetobacter* han sido reportadas como BPCV (Joseph B, Patra RR, Lawrence, 2007). Estas bacterias están asociadas a muchas de las especies de plantas que están presentes en la mayoría de los ambientes y se encuentran ampliamente representadas en cuanto a géneros microbianos, pudiendo aumentar la disponibilidad de nutrientes, transformarlos a formas asimilables por la planta, producir sustancias promotoras de crecimiento (fitohormonas) o servir como control biológico de fitopatógenos (Bashan, Y y Holguin, G, 2007).

Dado el interés creciente en la reducción del uso de productos agroquímicos y también por la agricultura ecológica, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal constituyen una alternativa al uso de fertilizantes y agroquímicos, y además pueden ampliar el espectro de suelos que se pueden utilizar para el cultivo (Ahemad y Kibret, 2014; de-Bashan y cols; 2012).

Durante décadas, los estudios de promoción de crecimiento con BPCV se han centrado en el aislamiento y evaluación de características bioquímicas de los aislados, con el fin de tener bancos de cepas promisorias para el desarrollo de productos biofertilizantes o bioestimulantes (Bashan, 1998; Dinesh et al., 2015).

Los BPCV pueden favorecer el crecimiento vegetal por un amplio rango de mecanismos como solubilización de fosfato inorgánico, disminución de los niveles de etileno en plantas, fijación de

nitrógeno atmosférico, biocontrol de enfermedades de plantas, y producción de fitohormonas, sideróforos y ácidos orgánicos (Datta et al., 2011).

### **3.2.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITROGENO (N<sub>2</sub>)**

La inoculación con BPCV, contribuye a la implantación, desarrollo y producción de cultivos tales como arroz, trigo y maíz (García de Salamone et al., 2007; Baldani et al., 2008). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) adquiere relevancia y puede ser incorporada a través de ciertas asociaciones cereal BPCV para aportar nitrógeno (N<sub>2</sub>) al agro ecosistema (García de Salamone et al., 1996; Urquiaga et al., 2004). Con el aumento del costo de los fertilizantes químicos y la preocupación por la contaminación ambiental, el papel de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en plantas debe ser potenciado ya que la FBN permite que la agricultura sea más productiva y sostenible sin dañar el medio ambiente. (Loredo-Osti. et al., 2016).

Debido a esto, se comenzó a investigar todo lo relacionado con los métodos de conservación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal para seguir con los estudios acerca de fertilizantes biológicos basado en poblaciones microscópicas. (Muthukumarasamy, R, et al., 2002).

La fijación del nitrógeno se define como la oxidación o reducción del nitrógeno para dar amonio u óxidos. Consiste en la conversión del nitrógeno atmosférico a formas metabolizables, que puedan ser incorporadas por los seres vivos. Estas formas son el ion amonio (+) o los iones nitrito (-) o nitrato (-). Otras sustancias como el dióxido de nitrógeno, reaccionan fácilmente para originar algunas de las anteriores. (García, S, 2011)



### 3.2.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE FÓSFORO (P)

El fósforo después del nitrógeno es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y, además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg kg<sup>-1</sup>. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodríguez.M. et.al 1995). Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix A. et al. 2007).

En estas condiciones, la utilización biotecnológica de microorganismos con capacidad para solubilizar las reservas fosfóricas del suelo merece especial atención por sus múltiples ventajas (Antoun, 2012; Zaidi y otros, 2014).

Desde una perspectiva nutricional, el P disponible para las plantas es el fosfato inorgánico (Pi) presente en la solución del suelo como iones ortofosfato, procedentes de la mineralización de materiales orgánicos y la solubilización de fuentes minerales (Gojon, 2009), cuya concentración, varía en forma considerable temporal y espacialmente (200 - 5000 mg P kg<sup>-1</sup>) (Arai y Sparks, 2007; Sharpley, 2012; Gojon y otros, 2009; Robinson, 2005). Como respuesta evolutiva a la baja disponibilidad del P en los suelos, las plantas desarrollaron diferentes estrategias morfológicas, bioquímicas y simbióticas adaptativas para incrementar la adquisición del Pi y/o para mejorar la eficiencia de su utilización interna (Vance y otros, 2003; Lambers y otros, 2006; Lambers y otros, 2011), siendo una de las más importantes la asociación de la raíz con microorganismos del

suelo, capaces de mineralizar y/o solubilizar las fuentes de P orgánicas e inorgánicas, respectivamente.

El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son solubilizados es la disminución del pH del medio extracelular hasta valores aproximados a 2,0 que son necesarios para que se pueda llevar a cabo la solubilización. Las bacterias son capaces de convertir el fosfato tricalcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en fosfato di y monobásicos asimilables para las plantas. Muchas bacterias utilizan la ruta metabólica de la glucosa para la producción de estos ácidos, provocando la liberación del fósforo al medio (Beltrán P, 2014). (Constanza L, et al., 2014).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato son un grupo funcional de BPCV capaces de solubilizar fosfatos minerales que han sido fijados en los suelos y que no pueden ser utilizados por las plantas en su nutrición; por ello su rol ecológico es esencial (Beltrán M 2014)

En los suelos la disponibilidad del fósforo es esencial para el crecimiento vegetal porque constituye más de 0,2% del peso seco de la planta (Banerjee et al., 2010). Las plantas adquieren el fosfato a partir de la solución del suelo en forma inorgánica en estado soluble como fosfatos mono y dibásicos, siendo necesario un pH de 6,5 para que el ion ortofosfato en el suelo sea aprovechable por las plantas, dado que a ese pH la precipitación de los fosfatos de aluminio y calcio disminuye (Sylvia et al., 1995).

La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal la mayoría de los aislamientos gram positivos y algunos gram negativos pueden perder su capacidad de solubilizar fosfatos tras repetidos subcultivos (Banik y Day, 1983; Kucey, 1983; Gyaneshwar et al., 2002).

En Colombia se han desarrollado estudios sobre la capacidad de solubilización de microorganismos rizosféricos asociados con distintos tipos de ecosistemas, tanto naturales como agroecosistemas (Vera et al., 2002; Moratto et al.; 2005, Torres et al., 2006; Beltrán, 2009) que incluyen diferentes cultivos comerciales como arazá, cebolla, papa y arroz.

En cuanto a investigaciones de campo, Pandey et al. (2006) han demostrado el potencial biotecnológico de la aplicación de microorganismos nativos en la promoción de crecimiento vegetal. La inoculación de suelos o semillas con microorganismos solubilizadores de fosfato ha sido ampliamente utilizada para mejorar el crecimiento y la producción de las cosechas (Banerjee et al., 2010). Por otra parte, Guang-Can et al. (2008) reportaron una correlación positiva entre el número de bacterias solubilizadoras de fosfato en la rizósfera y la toma de fosfato y rendimiento de grano en varios cultivos agrícolas.

Finalmente, en Colombia se comercializa un bioinsumo producto de la investigación que se realiza sobre microorganismos solubilizadores de fosfatos en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, cuyo ingrediente activo es *Penicillium janthinellum*; este producto está dirigido especialmente al cultivo del arroz, y produce incrementos del rendimiento entre 5% y 38% con respecto a cultivos no inoculados (Moreno et al., 2007).

### **3.2.3 *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* COMO BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL**

El género *Bacillus spp.* Comprende en un gran número de diversas formas de bastón, Gram positivo, oxidasa y catalasa positiva. Son bacterias móviles por flagelos peritricos y aeróbios

estrictos en su mayoría (Sneath A.g et.al, 1989). En los medios de cultivo líquidos crecen formando un “velo” en la superficie (Wilson. S. et.al, 2000). Miembros de este género son capaces de producir endosporas, las que resisten altas temperaturas y factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (Sneath A. et.al, 1989).

Son bacteria Gram positivas, aeróbicas, que se encuentra comúnmente en el suelo. Pertenecen al reino: Bacteria, clase: *Bacilli*, género: *Bacillus*. Entre las características destacadas de estos microorganismos está su capacidad para controlar ciertas enfermedades en cultivos vegetales. Para esto se ha descubierto que produce ciertos compuestos de bajo peso molecular con mucha afinidad por el hierro, evitando la germinación de las esporas de hongos patógenos. (CWei Y. et.al 2005).

Además, producen antibióticos muy efectivos contra los hongos y, cuando se instala en las raíces y hojas, induce a la planta a producir fitoalexinas que confieren resistencia al ataque de hongos y nematodos patógenos. Esta es una característica que tiene muchas ventajas en comparación con los fungicidas químicos, ya que no es tóxico para humanos, animales y plantas y no constituye un contaminante ambiental. (Edwards M, 2008).

Estos microorganismos tienen características importantes como el control biológico de hongos y bacterias en cultivos, controlando efectivamente enfermedades como mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris*), peca bacteriana (*Pseudomonas syringae*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y cancro bacterial (*Clavibacter michiganensis*), estas enfermedades se han presentado especialmente en cultivos de tomate; pudrición acuosa (*Erwinia carotovora*), especialmente en papas almacenadas y cáncer bacterial (*Pseudomonas syringae*) en carozos (L. Santamaría 2016)

Las ventajas del control biológico sobre los productos químicos es que son más limpios ecológicamente, no dejan residuos, son biodegradables y no generan resistencia, como los antibióticos.

Desempeñan un papel en la adhesión a las células huésped y otras superficies que se encuentran en el medio ambiente, siendo los principales antígenos de superficie. Estos ácidos están compuestos de fosfatos poliglicosilo (es decir, glicerol o ribitol-P-P) con mono y disacáridos en las unidades de repetición. Los fosfatos dentro de las cadenas de ácidos teicoicos dan la superficie celular de una carga global negativa, lo que permite la absorción eficiente de diversos cationes tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en la célula. Su capacidad de diferenciarse en una endospora hace de *Bacillus* microorganismos altamente resistentes a ambientes oligotróficos,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la desinfección química, y otras condiciones adversas. (Abous A, Cherif A, Daffonchio, 2009).

Son los organismos más ampliamente representados en el suelo. Debido a su capacidad para formar esporas y soportar una variedad de condiciones ambientales variables, se adaptan fácilmente a diversos hábitats. Los avances en el análisis cromatográfico de (FAME por sus siglas en inglés) perfiles de éster metílico de ácido graso de células enteras han hecho esta técnica suficientemente sensible y fiable para la agrupación de *Bacillus* a nivel de especie.

Estos microorganismos son considerados como promotores del crecimiento, debido a que produce hormonas en el medio de cultivo y tiene influencia en el desarrollo de diversas gramíneas (Gutierrez et al., 1996). Se ha encontrado que cuando se asocia a la rizósfera puede modificar la actividad fisiológica de las plantas mejorando el crecimiento de éstas (Perry et al., 1987; Bashan et al., 1996).

### 3.3 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN MICROBIANA

Los microorganismos son unos insumos valiosos en la industria, la agricultura, biomedicina y como material de referencia para investigaciones en las diversas áreas. Sin embargo, el mantenimiento en condiciones por fuera de su ambiente natural (*ex situ*) puede provocar alteraciones a nivel morfológico, genético y bioquímica de las cepas, inclusive la pérdida de la viabilidad. Por tal razón, se utilizan métodos para conservar los microorganismos en el laboratorio, y de esta manera evitar dichos efectos indeseables sobre las cepas de interés.

Durante la conservación microbiana se proporcionan las condiciones para que el microorganismo disminuya su metabolismo, simulando los mecanismos naturales de respuesta de la célula ante el estrés (García Uruburu 2000)

Según investigaciones de García Uruburu (2000) la conservación de cepas microbianas persigue tres objetivos:

1. Que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminantes durante el proceso de conservación.
2. Que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80 % de las células.
3. Que las células permanezcan genéticamente estables.

La elección del método de conservación debe ser el resultado tanto del análisis de aspectos de conveniencia técnica (personal científico, disponibilidad de equipos, infraestructura, costos); así como del microorganismo a conservar, teniendo en cuenta la susceptibilidad y los procesos de conservación, el periodo de mantenimiento que permita cada método y el mantenimiento de las

características interesantes de cada cepa (estabilidad genética y bioquímica) (Hernández, et.al 2003).

### **3.3.1 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO**

Los métodos de conservación a largo plazo son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Aun así, no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo. Entre estos se destaca la criopreservación (Gámez R 2008)

#### **3.3.1.1 CRIOPRESERVACIÓN.**

La criopreservación es un procedimiento por el cual las células son suspendidas en una solución de sales y un compuesto orgánico, generalmente de bajo peso molecular, para posteriormente ser enfriadas a temperaturas bajo cero (generalmente -196 °C en nitrógeno líquido), se almacenan durante un periodo de tiempo, para luego ser recuperadas mediante el restablecimiento de la temperatura reanudando su funcionamiento. Esta técnica se recomienda para organismos que no son preservados en forma exitosa en el proceso de liofilización y ha sido usada para almacenamiento de esporas o micelio de un gran número de microorganismos a largo tiempo. (Nakasone K. et al., 2004).

Los cultivos se almacenan mezclados con aditivos crioprotectores, que son sustancias que minimizan el daño ocasionado por la congelación, estos incluyen: Dimetil sulfóxido (Me<sub>2</sub>SO), glicerol, suero, albúmina sérica, leche, peptona, extracto de levadura, metanol, polivinilpirrolidona, (PVP), extracto de malta, sorbitol y azúcares como sacarosa y glucosa (Pan J, et.al 2011).

### **3.3.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO**

Los métodos de conservación a corto o mediano plazo se utilizan cuando no se tiene una infraestructura adecuada, o no se tienen las condiciones ni los recursos para implementar un método a largo plazo, por ejemplo, un ultracongelador. El método comúnmente usado es la preservación en aceite mineral, donde el microorganismo en cuestión se siembra en un medio adecuado y una vez crecido se agrega aceite mineral completamente estéril y se almacena a 4°C. (Duque, et al., 2010).

#### **3.3.2.1 PRESERVACIÓN EN ACEITE MINERAL**

La esencia del método está en cubrir el cultivo bien desarrollado sobre medio nutritivo líquido o agarizado con el aceite mineral no tóxico y estéril, como la parafina o vaselina; también se usa petróleo líquido (Uzunova D. et, al 2004). Los cultivos pueden mantenerse por varios años, o en casos excepcionales por más de treinta y dos a 15-20o C (Nakasone K.et al., 2004). Este método está especialmente recomendado para conservar micelio u hongos no esporulados, donde la congelación puede ser adversa para ellos.

Se recomienda este método en climas tropicales para prevenir la desecación del cultivo. Es un método fácil de realizar y no requiere de equipos caros. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. (Nakasone K.et al., 2004)

Su mayor desventaja es que el microorganismo puede continuar su crecimiento, al menos durante los primeros períodos, y así ocurrir que sobrevivan mutantes capaces de crecer bajo las condiciones adversas que implican la conservación (Nakasone K. et al., 2004).



### **3.3.3 METODOS ALTERNATIVOS**

Los métodos alternativos son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos anteriores, ya sea por limitaciones en infraestructura o porque el microorganismo no resiste los tratamientos de la conservación por dichos métodos. Conviene tener en cuenta que no se debe usar un único método alternativo, se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos. (García, D., Fern, F. U, 2008). Dentro de estos métodos, están la suspensión en agua destilada estéril y la desecación en papel filtro.

#### **3.3.3.1 SUSPENSIÓN EN AGUA DESTILADA ESTÉRIL**

Es un método muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en los hongos filamentosos, en períodos a veces superiores a cinco años (García M. y Uruburu F, 2005).

Aparentemente el agua suprime cambios morfológicos en muchos microorganismos (Nakasone K. et al., 2004). Es un método simple, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos por períodos prolongados, y evita mutaciones y contaminación (Pasarell. J y McGinnis. A, 1992; Malik y Hoffmann D.1993). La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia. (García M. y Uruburu F, 2005).

#### **3.3.3.2 PRESERVACIÓN EN PAPEL FILTRO.**

Se utiliza un papel Whatmann impregnándolo con una suspensión de bacterias (7.5 x UFC/ml). Posteriormente se seca en condiciones estériles y se almacena a 4°C. También es posible desecar el papel filtro inoculado por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) donde se utiliza un liofilizador sin que haya habido congelación previa de las células. (García, D, 2008).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

Este proyecto es un estudio cuantitativo, experimental en donde se evaluaron diferentes métodos de conservación aplicados para dos cepas de microorganismos: *Bacillus pumilus* GIBI206 y *Bacillus subtilis* GIBI200 por un tiempo de 5 trimestres y dependiendo de características específicas de estabilidad bioquímica y genética se determinará cuál es el método más viable para la conservar estos microorganismos conocidos como promotores de crecimiento vegetal.

### 4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Las bacterias evaluadas fueron aisladas en trabajos previos a partir de tejidos de plantas provenientes de cultivos caldenses de caña de azúcar y tomate, y se encuentran almacenadas en la colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales. Se tomó una muestra de cada uno de los siguientes microorganismos:

*Bacillus pumilus* GIBI206

*Bacillus subtilis* GIBI200

### 4.3 PROCEDIMIENTO

La investigación se realizó en 5 etapas: crecimiento y caracterización del microorganismo, conservación, viabilidad celular, estabilidad bioquímica y estabilidad genética.

### **4.3.1 CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO:**

#### **4.3.1.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO**

A los crioviales conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en la colección de microorganismos de la Universidad católica de Manizales, de las cepas de estudio (*Bacillus pumilus* GIBI200 y *Bacillus subtilis* GIBI206), se les realizó un choque térmico por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  para que la célula realice su proceso de adaptación al medio, posteriormente fueron inoculados en el medio de cultivo DYGS (Glucosa 0.8g, Ácido Málico 0.8g, Peptona Bacteriológica 0.6g, Extracto de levadura 0.8g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, Ácido glutámico 0.6g, pH 5.8 – 6.0 y el pH final después de la autoclave 7) y se incubaron durante 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  con una agitación de 15 rpm. (Muñoz Rojas, J. Caballero Mellado, J., 2001); y Valenzuela, T, (2014). A partir de estos inóculos se hizo un repique sembrando por agotamiento en agar papa dextrosa ADP (Infusión de papa 2g, dextrosa 10g, agar 7.5g, pH final 5.7) y se incubaron de 24 a 48 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.1.2 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LAS CEPAS.**

Se llevaron las cepas al estereoscopio y se observaron sus características macroscópicas considerando forma, bordes, elevación, superficie, consistencia, color, luz transmitida, luz reflejada entre otras, características propias de morfologías de colonias bacterianas. (Davis D 1997).

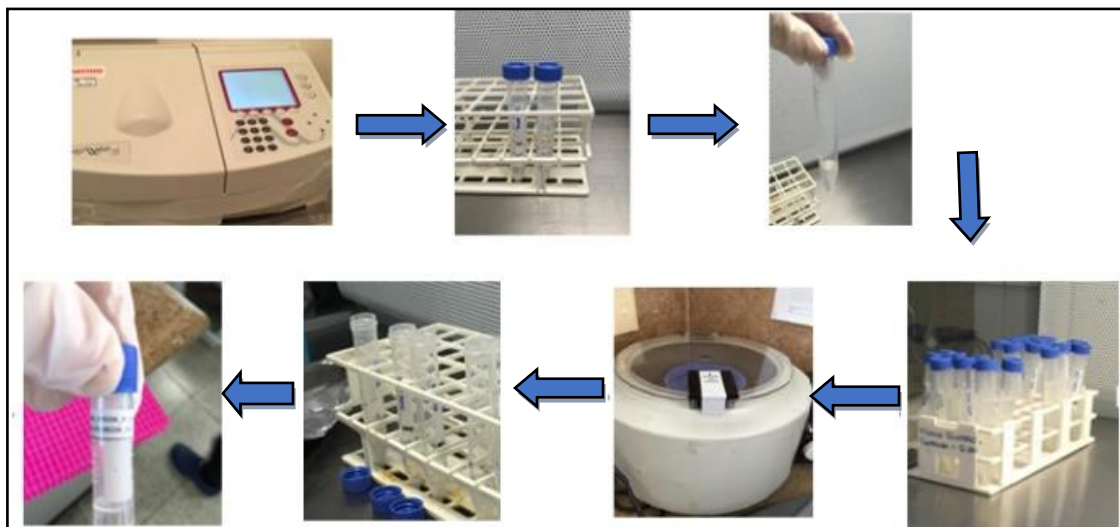
#### **4.3.1.3 DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS.**

*Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* son bacilos gram positivos, como ha sido descrito por Cwei Y. et.al 2005.

## 4.4 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.

### 4.4.1 CONSERVACIÓN POR CRIOPRESERVACIÓN

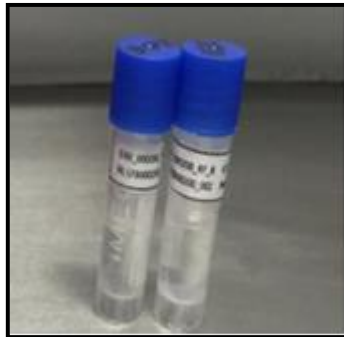
Siguiendo la metodología descrita por Sánchez Leal y Corrales Ramírez, (2005), se inoculó en frascos con caldo nutritivo cada uno de los microorganismos *Bacillus subtilis* GIBI200, *Bacillus pumilus* GIBI206 como se muestra en la figura 1. Después, se incubó a 30° por 150 rpm para obtener una suspensión bacteriana en fase exponencial de crecimiento con una concentración suficiente para que la densidad óptica a 600 nm corresponda a 0.9-1.0 para obtener una concentración estándar de  $10^8$  cels/ml.



**Figura 1. Equipos utilizados para la medición de la biomasa**

Posteriormente, se recuperó la biomasa centrifugando los frascos a 4000 rpm por 45 minutos, después, se descartó el sobrenadante y se agregó 5 ml de agua destilada estéril para realizar el lavado, se agitó en vortex para diluir el botón de células, nuevamente se centrifugó por 20 minutos a la máxima velocidad. Los datos correspondientes a la densidad óptica se muestran en la sección de resultados.

Después de verificar las densidades ópticas, se adicionó glicerol al 10 % en los tubos, se pasó por vortex y se alicuotó 1 ml de la solución en tubos eppendorf de 2 ml , se rotuló adecuadamente, se realizó 3 lotes de 9 viales cada uno, los cuales se almacenaron en un freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2. Crioviales**

#### **4.4.2 SUSPENSIÓN EN AGUA DESTILADA ESTÉRIL.**

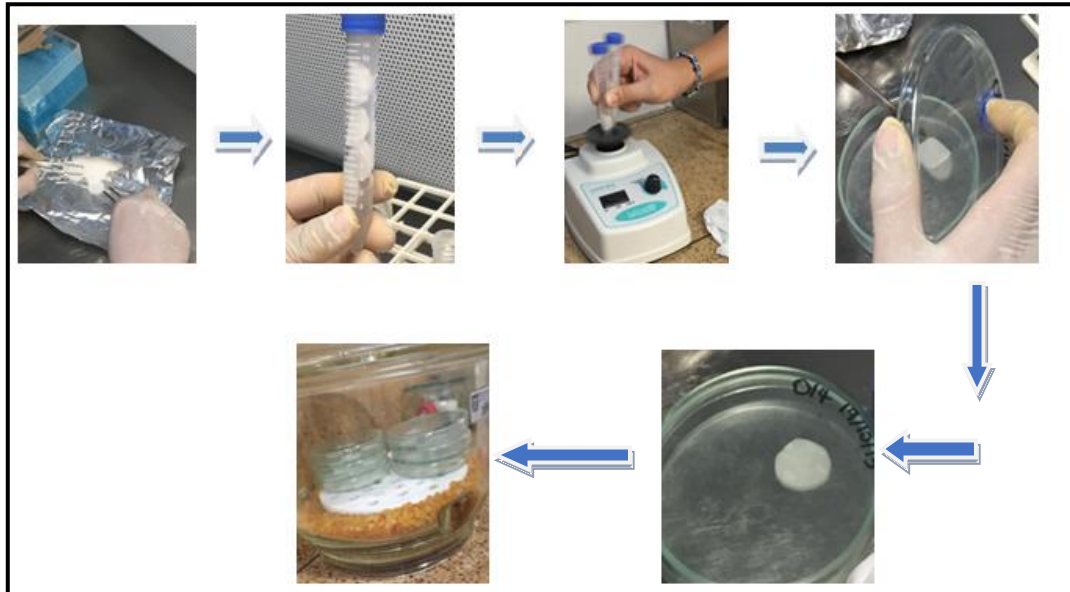
Siguiendo la metodología descrita por Martínez, A., Lourdes Bueno y Gallardo, R, 1998, después de concretar las densidades optimas en agua destilada, se adicionó 1ml de esta solución a tubos Eppendorf de 2ml, se rotuló adecuadamente, se realizaron 3 lotes de 9 viales y se conservaron a temperatura ambiente.

#### **4.4.3 DESECACIÓN EN DISCOS DE PAPEL FILTRO.**

La conservación en discos de papel de filtro se realizó según la metodología descrita por García y Uruburu (2001) y modificada por Sosa, A (2007); para ello se utilizó papel filtro estéril absorbente Whatman N° 3 cortados en forma redonda con un diámetro de 2 cm que se impregnó en una suspensión bacteriana de células ( $10^8$  UFC/mL) en agua destilada estéril obtenida de la misma forma mencionada anteriormente, luego, con unas pinzas estériles se pusieron los discos de papel filtro en una caja Petri y se llevaron al desecador para que absorba la cantidad de agua.

Posteriormente los papeles filtro ya totalmente secos se guardaron en bolsas de papel estériles, después se cubrieron con papel aluminio y se refrigeraron de 2 a 5°C, como se observa en la figura 3.

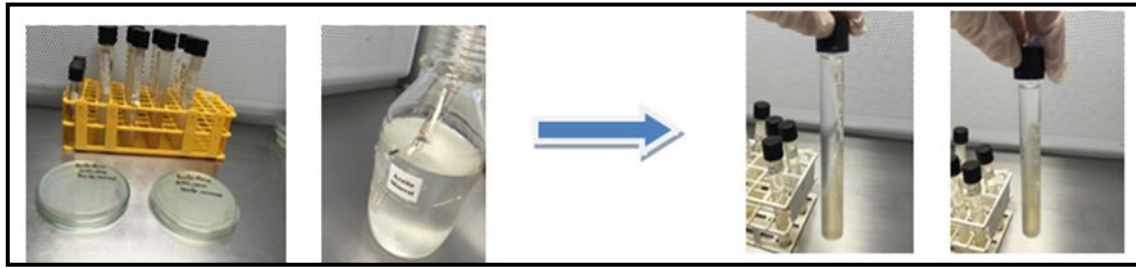
Se conformaron 3 lotes de 12 discos cada uno.



**Figura 3. Conservación en papel filtro**

#### **4.4.4 ACEITE MINERAL**

Se inoculó medio papa dextrosa (APD) en tubos de vidrio, se dejaron inclinados para que el agar se solidifique de tal manera que al momento de repicar el microorganismo me permita tener colonias aisladas, posteriormente se repico cada uno de los microorganismos y se incubo a 30°C de 24 a 48 horas. Luego de obtener un crecimiento adecuado se agregó aceite mineral hasta la punta del tubo y se dejó a temperatura ambiente en un lugar donde no estén expuestos a la luz (Cárdenas, 2010), como se muestra en la figura 4.



**Figura 4. Conservación en aceite mineral**

#### **4.5 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS**

Se realizó una evaluación de cada uno de los métodos de conservación (criopreservación, agua destilada, aceite mineral y papel filtro) durante 5 trimestres, se evaluó la viabilidad y la solubilización de fosforo de cada microorganismo por cada medio de conservación.

Para los métodos de criopreservación, agua destilada y papel filtro, se realizó mediante un conteo en placa, se elaboró una tabla por cada microorganismo en cada trimestre con las características descritas por Valencia Z. (2004), Pérez y colaboradores (2006) y Díaz (2009), para las colonias desarrolladas en superficie, a partir del procedimiento de “conteo de microorganismos mediante técnica de extensión superficial en placa”. Para esto se realizó diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución  $10^8$ , se sembraron por superficie en agar APD las diluciones  $10^7$  y  $10^8$  de los inóculos a las 24 horas y a los 3, 6, 9, 12 y 15 meses post conservación, el número de células se expresan en UFC/ml.

Para el método de aceite mineral, no se aplicó el porcentaje de viabilidad celular, debido a que no se realizó recuento en placa. Para este método, solamente se verificó, que las dos cepas *Bacillus pumilus*: GIBI206 y *Bacillus subtilis*: GIBI200 estuvieran puras durante el tiempo de

conservación; para esto se tomó una asada de crecimiento de una colonia de la cepa conservada en aceite mineral y se hizo un aislamiento por agotamiento con estriado básico durante cada trimestre hasta el 5 trimestre (15 mes de conservación) Lo anterior con el fin de monitorear la cepa macroscopicamente (borde, color, textura, pigmentación etc.) crecimiento abundante o escaso y microscópicamente (tamaño, forma y coloración de Gram) en transcurso del tiempo.

Para los métodos de conservación correspondientes a criopreservación, agua destilada y papel filtro, la viabilidad se considera como un porcentaje de recuperación de 100% a lo obtenido en el primer repique efectuando a las 0 horas (antes de iniciar la conservación). Se determina la viabilidad de las bacterias antes y después de ser conservadas por los 3 métodos a utilizar (criopreservación, agua destilada y papel filtro). En este orden de ideas, la viabilidad celular se calculará usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{UFC OBTENIDAS}}{\text{UFC INICIALES}} \times 100$$

#### **Ecuación 1. Porcentaje de viabilidad celular**

### **4.6 EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFORO DE LOS MICROORGANISMOS**

La determinación cuantitativa de la solubilización de fósforo partió de un aislamiento de colonias en agar APD para luego crecer en medio líquido DYGS. Se incubó a 30°C en agitación constante (150 rpm) por 24 horas. Posteriormente se preparó el inóculo centrifugando las colonias para obtener la biomasa, se llevó a cabo por siembra directa de 20 uL distribuidos en 3 secciones delimitadas del medio de cultivo NBRIP sólido (Glucosa 10g, Ca<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> 5g, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub> O 5g



0,25g, KCl 0,2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0.1g, Agar 20g, H<sub>2</sub>O destilada 1L) (Nautiyal A. et.al 1999) al cual se le añadió azul de bromofenol como indicador de pH a una concentración de 0,025 g/l, lo cual permite observar la producción de ácido por un cambio de coloración de azul a amarillo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se determinó la capacidad de solubilización del fósforo por cada bacteria a las 24 horas y a los 3, 6, 9, 12 y 15 meses de ser sometidas a conservación por los diferentes métodos, midiendo el tamaño de las colonias y los halos a las 24, 48 y 72 horas después de incubación (Ramírez, L. et, al 2014).

Para hallar el índice de solubilización (IS), se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Índice de solubilización (IS)} = \frac{\text{Diámetro Total (Diámetro de la colonia + Diámetro del halo)}}{\text{Diámetro de la colonia.}}$$

**Ecuación 2. Índice de solubilización (IS) según Kumar y Narula, (1999).**

#### **4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Tanto para obtener los valores de viabilidad celular como para los porcentajes de solubilización de fósforo se utilizó un método por triplicado, estos resultados se analizaron usando RStudio Server v1.1.423, con el paquete Agricolae Versión: 1.2-8. Además, En esta investigación se realizaron las respectivas pruebas Pos Anova en cada trimestre con el fin de encontrar cual es el mejor método en cuanto a la solubilidad del fósforo, esto con el fin de perfilar, especificar, y concretar una Hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los Test ANOVA con un nivel de aceptabilidad del 5% (Incertidumbre señalada en las gráficas) Los análisis descriptivos se evidencian en el Anexo 5.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DENSIDADES ÓPTICAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Los conteos por siembra masiva que se realizaron según la metodología planteada fueron concordantes con los promedios de las densidades ópticas obtenidas evidenciadas en la tabla 1, esto debido a que se mantuvo un conteo de  $10^9$  UFC/mL. Los resultados de las densidades ópticas corresponden a las lecturas por espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm que se muestran en el Anexo 4.

**Tabla 1. Medición de la biomasa, resultados promedios de densidad óptica GIBI200 y GIBI206.**

DENSIDAD ÓPTICA				
	GIBI200	Desviación estándar	GIB206	Desviación estándar
<b>Promedio</b>	0,9915	±0,131	0,968	±0,125

### 5.2 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

Se observaron las siguientes características macroscópicas:

***Bacillus pumilus* GIBI206:**

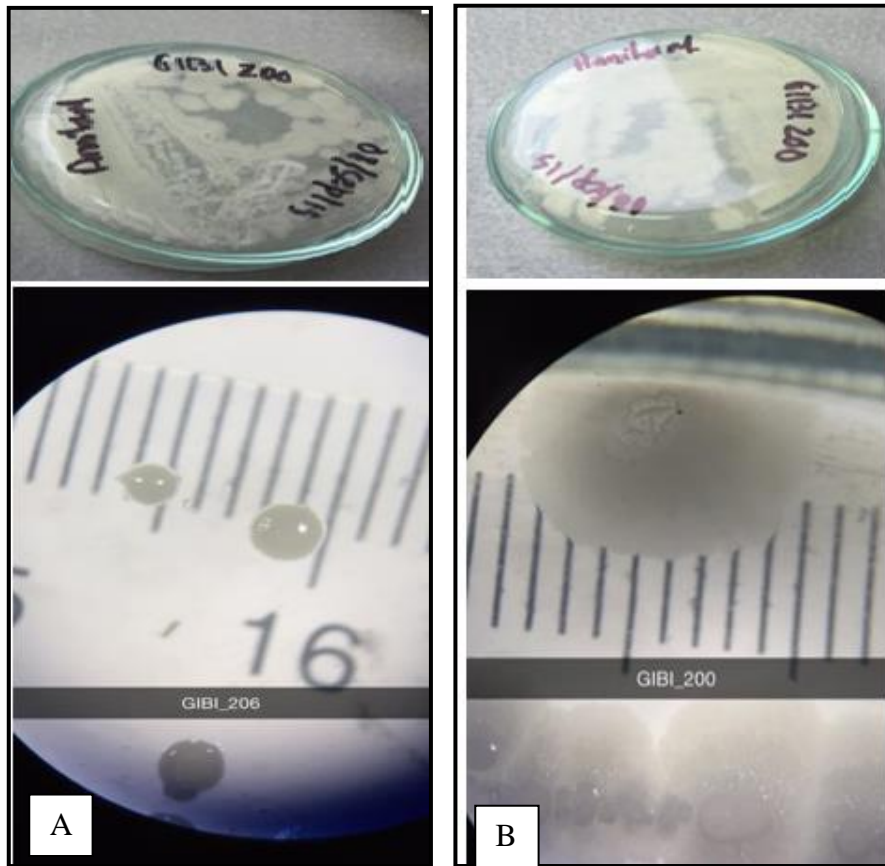
Las colonias son cremosas, con borde regular, planas, pequeñas, húmedas, circulares, con un halo traslucido alrededor y de color amarillento como se muestra en la figura 5.

***Bacillus subtilis* GIBI200:**

Las colonias son cremosas, con borde regular, planas, muy grandes, húmedas, circulares, y de color blanco como se muestra en la figura 5.

Sus tamaños fueron:

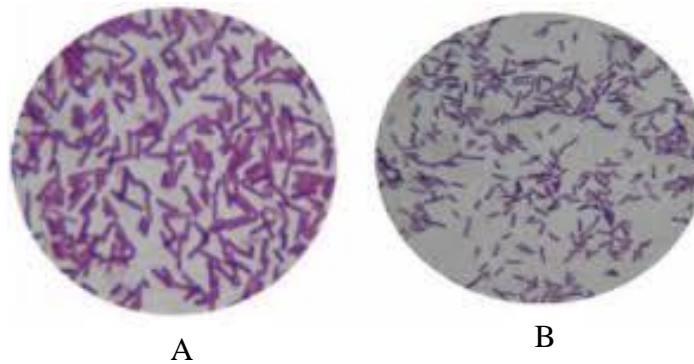
- *Bacillus pumilus*: 2.5  $\mu\text{m}$  aproximadamente
- *Bacillus subtilis*: 9  $\mu\text{m}$  aproximadamente



**Figura 5. Características macroscópicas. (A) *Bacillus pumilus* GIBI206, (B) *Bacillus subtilis* GIBI200.**

### 5.3 DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS.

Se realizó tinción de Gram en el cual se observaron: *B. pumilus*: Gram positiva; *B. subtilis* Gram positiva, como se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Características microscópicas. (A) *Bacillus subtilis* GIBI200, (B) *Bacillus pumilus* GIBI206.**

Se observó *Bacillus* gram positivos de 0,8 $\mu$ m de diámetro por 2 a 3  $\mu$ m con borde redondeado. Tomada de Moreno 2013.

### 5.4 VIABILIDAD CELULAR DE LOS MICROORGANISMOS

Los datos correspondientes a los conteos se muestran en el Anexo 1 y a continuación en la tabla 2 y 3 se evidencia los porcentajes de viabilidad para los métodos de conservación criopreservación agua destilada y papel filtro por cada periodo evaluado.

**Tabla 2. Porcentajes de viabilidad en función del tiempo y el método de conservación  
CEPA GIBI206.**

<i>Bacillus pumilus</i> GIBI206	TIEMPO (Trimestre) *	10 <sup>9</sup> UFC/mL FINALES	10 <sup>9</sup> UCF/mL INICIALES	VIABILIDAD (%)
Criopreservación	0	23	23	100,000%
Criopreservación	1	22	23	92,735%
Criopreservación	2	17	23	70,513%
Criopreservación	3	16	23	68,376%
Criopreservación	4	16	23	68,376%
Criopreservación	5	16	23	66,667%
Agua destilada	0	24	24	100,000%
Agua destilada	1	22	24	91,213%
Agua destilada	2	14	24	56,485%
Agua destilada	3	12	24	51,464%
Agua destilada	4	13	24	53,138%
Agua destilada	5	11	24	43,933%
Papel filtro	0	18	18	100,000%
Papel filtro	1	16	18	92,090%
Papel filtro	2	78x10 <sup>8</sup>	18	44,068%
Papel filtro	3	45x10 <sup>8</sup>	18	25,424%
Papel filtro	4	30x10 <sup>8</sup>	18	16,949%
Papel filtro	5	20x10 <sup>8</sup>	18	11,299%

\* El tiempo 0 corresponde a las primeras 24 horas.

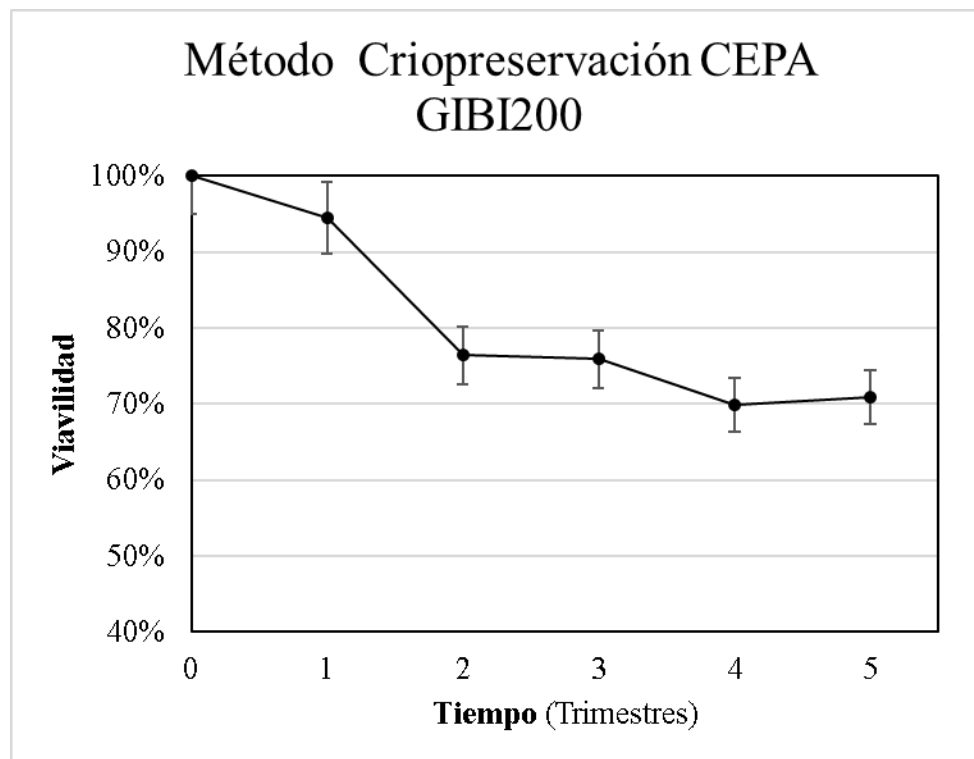
**Tabla 3. Porcentajes de viabilidad en función del tiempo y el método de conservación  
CEPA GIBI200**

<i>Bacillus pumilus</i> GIBI200	TIEMPO (Trimestre) *	10 <sup>9</sup> UFC/mL FINALES	10 <sup>9</sup> UCF/mL INICIALES	VIABILIDAD (%)
Criopreservación	0	22	22	100,000%
Criopreservación	1	20	22	94,444%
Criopreservación	2	17	22	76,389%
Criopreservación	3	16	22	75,926%
Criopreservación	4	15	22	69,907%
Criopreservación	5	15	22	70,833%
Agua destilada	0	19	19	100,000%

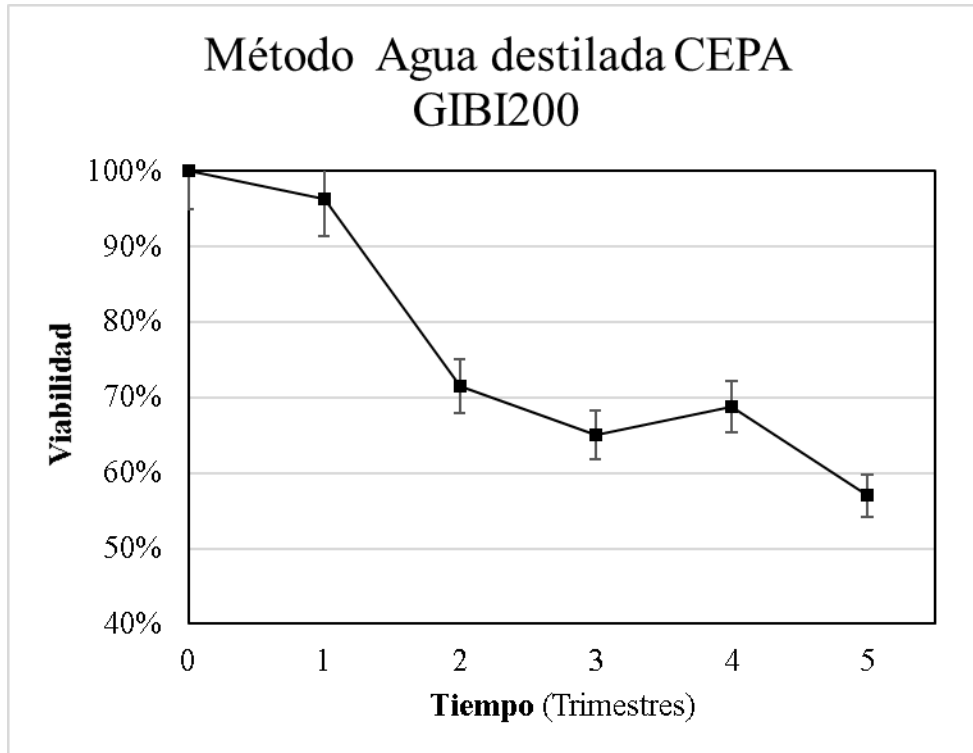
Agua destilada	1	18	19	<b>96,237%</b>
Agua destilada	2	13	19	<b>71,505%</b>
Agua destilada	3	12	19	<b>65,054%</b>
Agua destilada	4	13	19	<b>68,817%</b>
Agua destilada	5	11	19	<b>56,989%</b>
Papel filtro	0	17	17	<b>100,000%</b>
Papel filtro	1	16 x10 <sup>8</sup>	17	<b>94,675%</b>
Papel filtro	2	72 x10 <sup>8</sup>	17	<b>42,604%</b>
Papel filtro	3	39 x10 <sup>8</sup>	17	<b>23,077%</b>
Papel filtro	4	34 x10 <sup>8</sup>	17	<b>20,118%</b>
Papel filtro	5	15 x10 <sup>8</sup>	17	<b>8,876%</b>

\* El tiempo 0 corresponde a las primeras 24 horas.

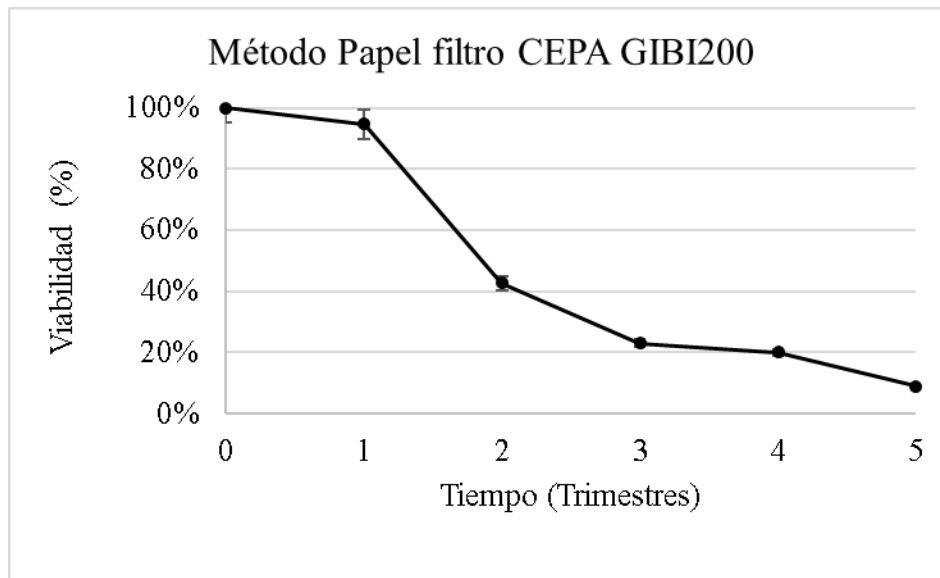
A continuación en las figuras 7,8,9,10,11 y 12 se muestran las graficas de los resultados mostrados anteriormente.



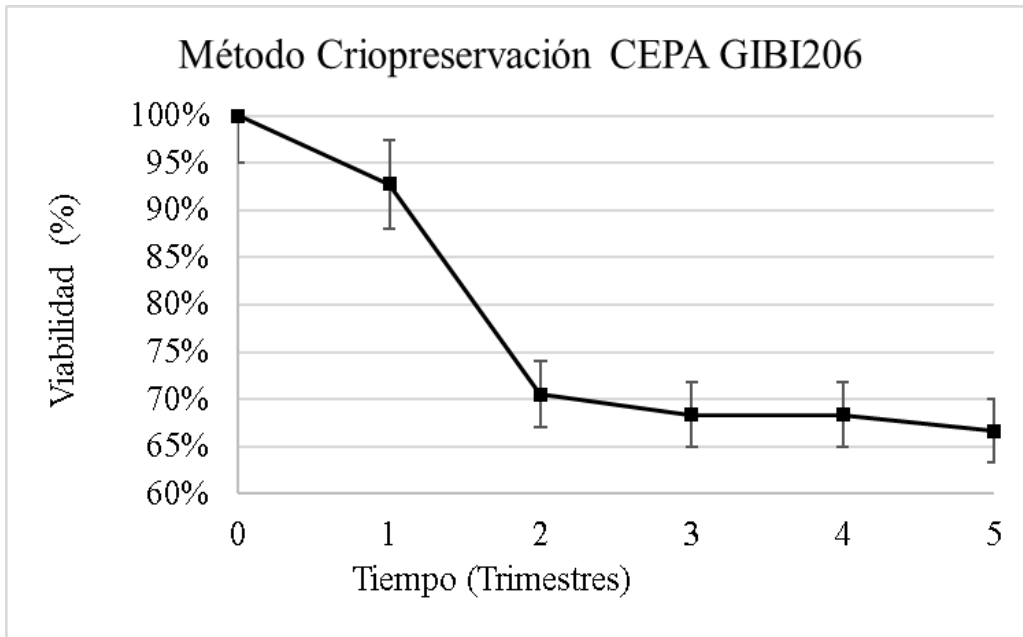
**Figura 7. Método de criopreservación CEPA GIBI200**



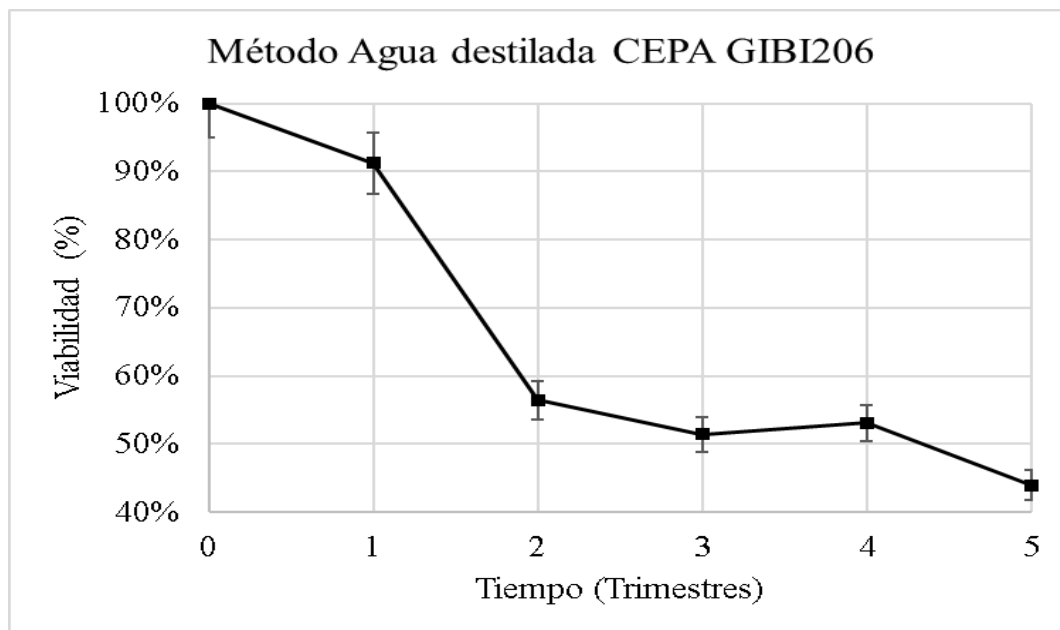
**Figura 8. Método de Agua destilada CEPA GIBI200**



**Figura 9. Método de Papel filtro CEPA GIBI200**

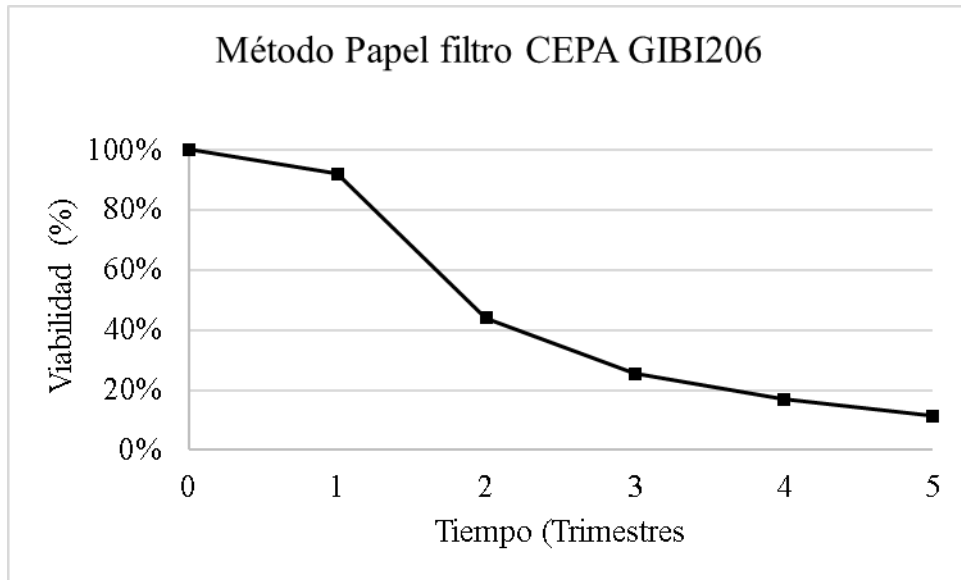


**Figura 10. Método de criopreservación CEPA GIBI206**



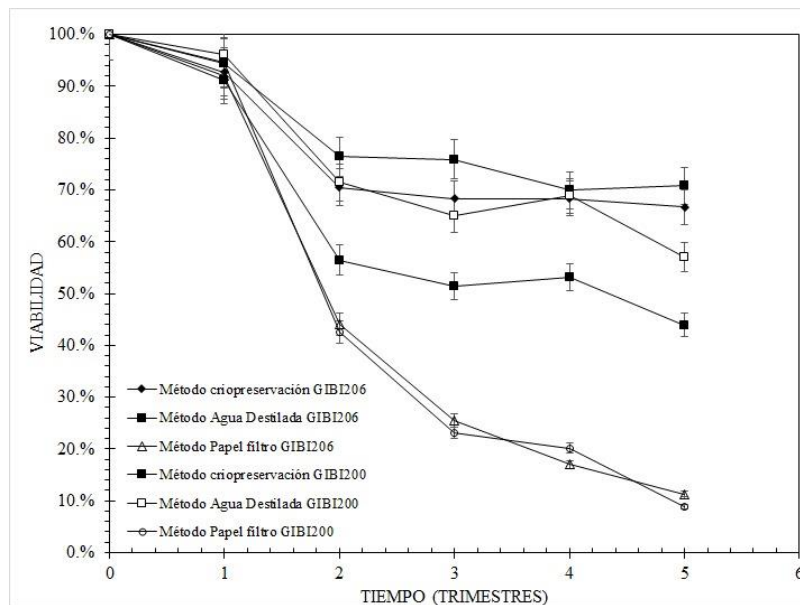
**Figura 11. Método de agua destilada CEPA GIBI206**





**Figura 12. Método de papel filtro CEPA GIBI206**

A continuación en la figura 13 se presenta de forma unificada la viabilidad en los métodos de criopreservación, agua destilada y papel filtro por cada periodo evaluado para cada cepa estudiada.



**Figura 13. Gráfica Unificada de resultados de viabilidad.**

### 5.4.1 VIABILIDAD CELULAR PARA EL MÉTODO ACEITE MINERAL

Como se había mostrado en la sección de metodología los resultados para aceite mineral en cuanto a viabilidad se realizaron diferente a los otros métodos de criopreservación, agua destilada y papel filtro.

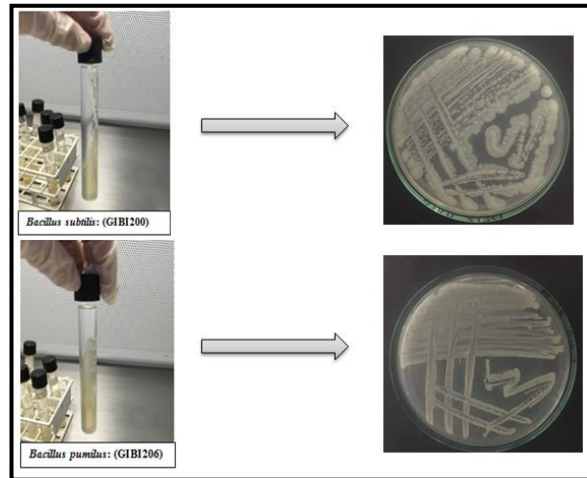


Figura 14. Cepas GIBI200 y GIBI 206 conservadas en aceite mineral y sus respectivos repiques en agar APD.

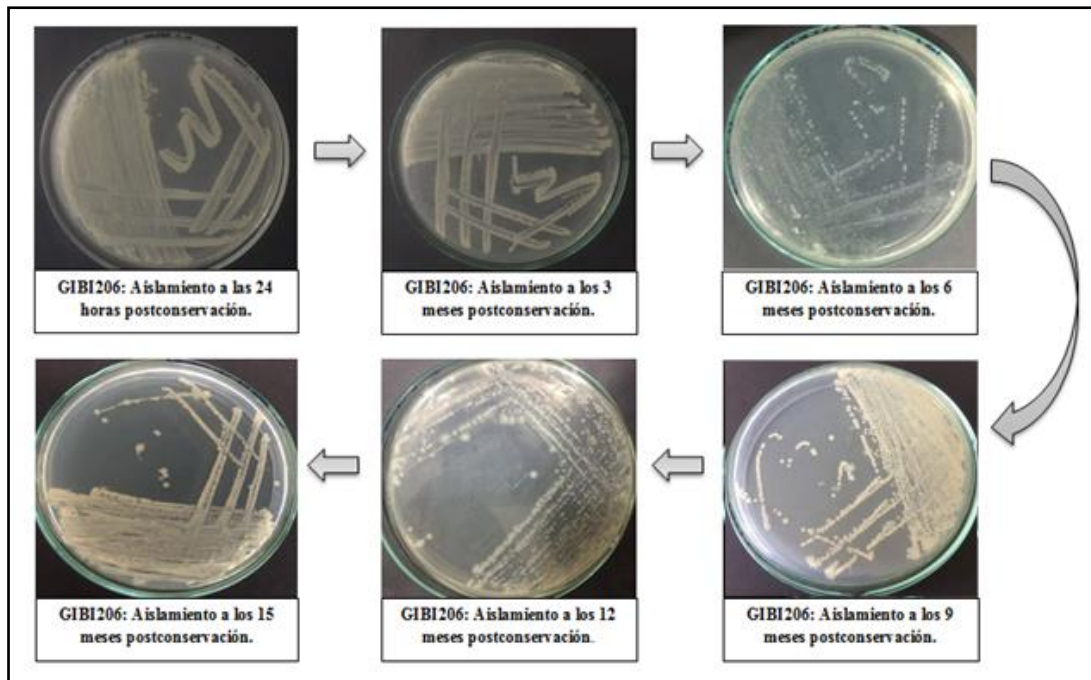
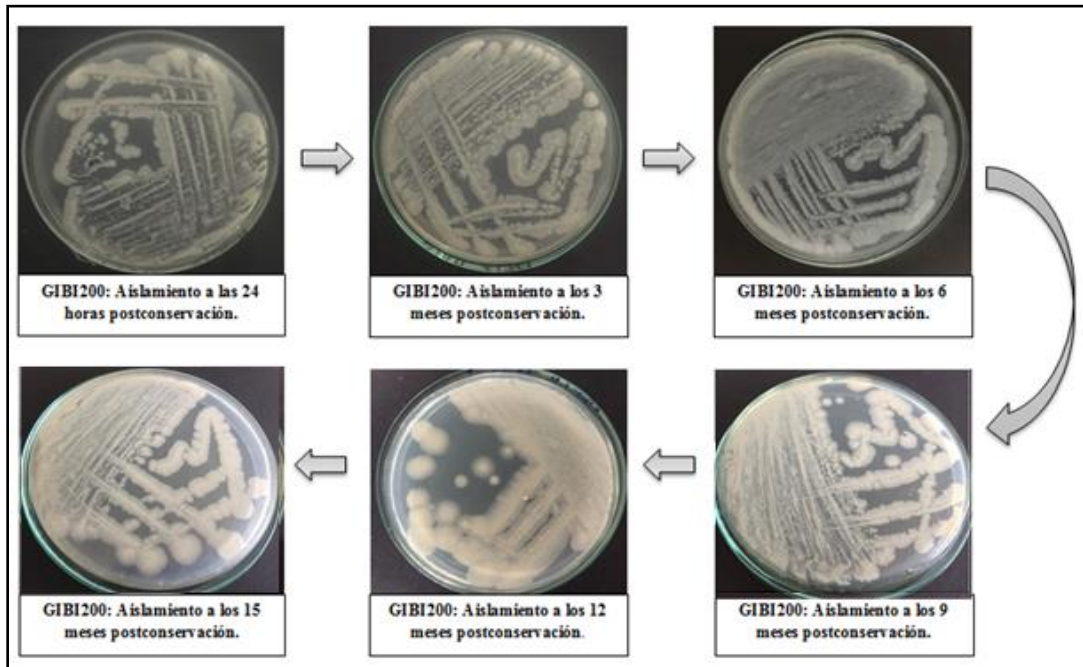


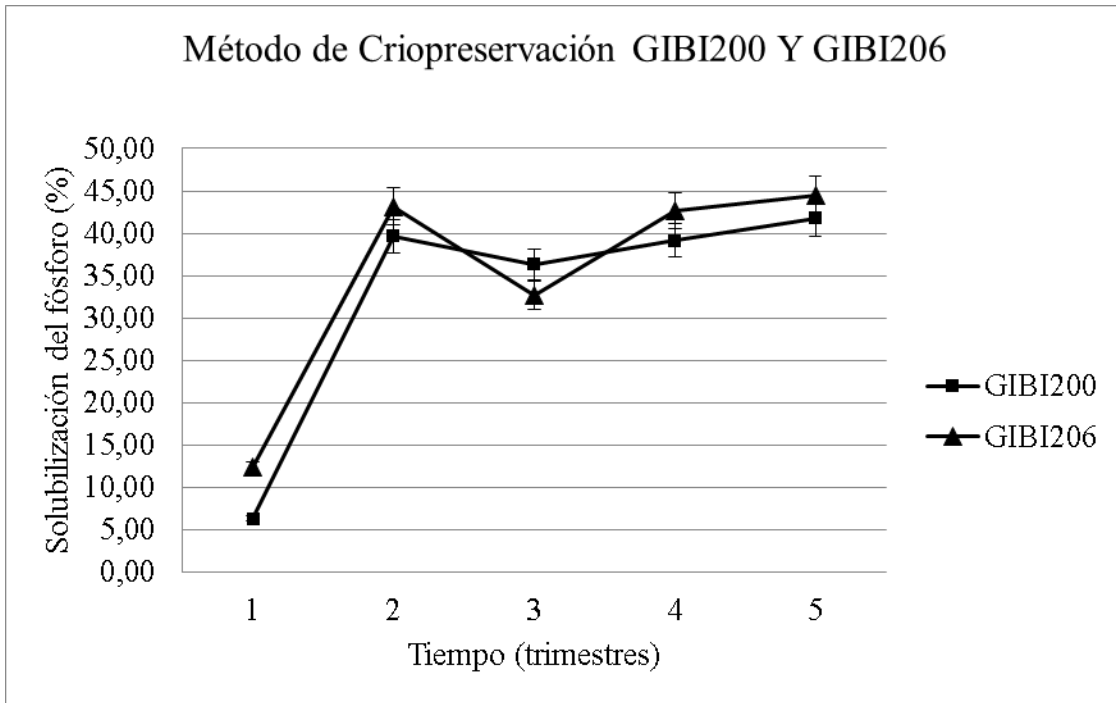
Figura 15. Aislamiento de la cepa GIBI206 conservada por el método de aceite mineral. Medio APD.



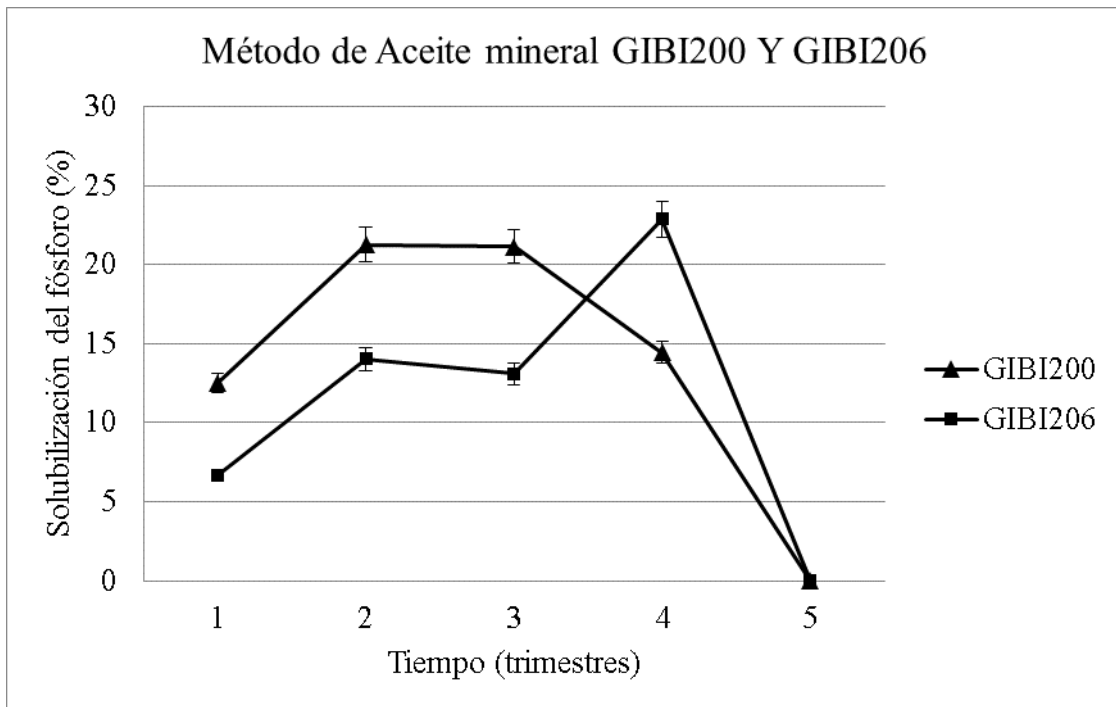
**Figura 16. Aislamiento de la cepa GIBI200 conservada por el método de aceite mineral. Medio APD.**

### **5.5 SOLUBILIZACIÓN DEL FÓSFORO.**

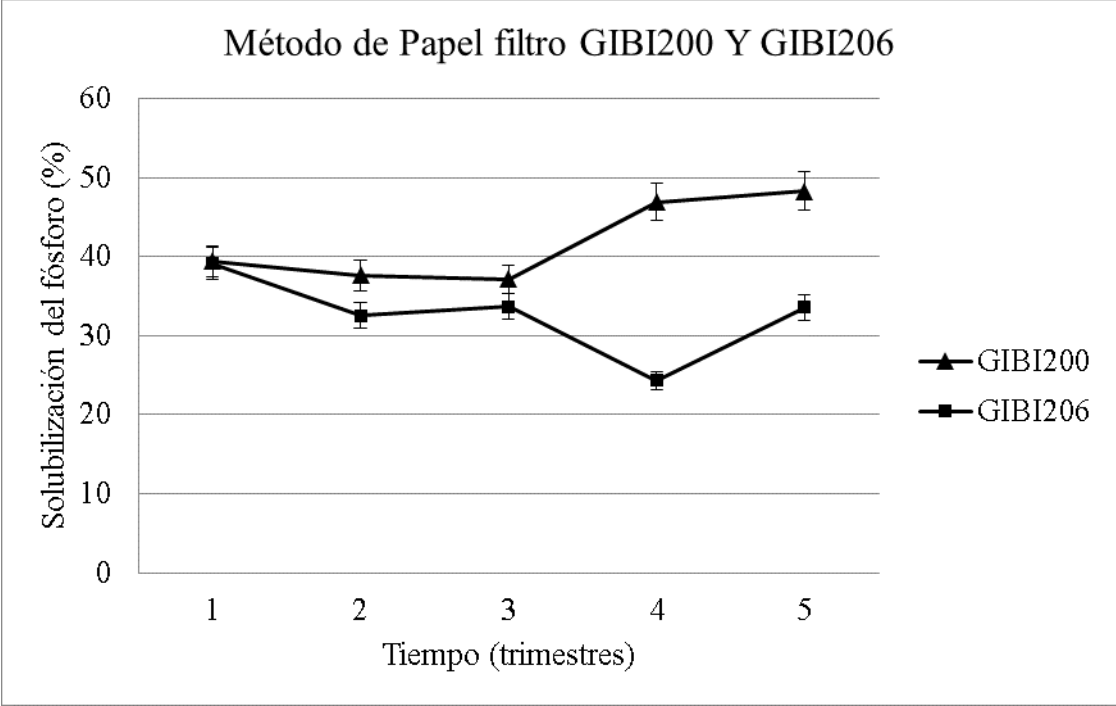
El análisis descriptivo de los porcentajes de eficiencia de solubilización del fósforo en cada periodo de medición se muestra en el Anexo 2 correspondiente a estadísticas descriptivas. El análisis incluye medidas de tendencia central y de dispersión. A continuación, en las figuras 17,18,19,21 y21 se puede evidenciar los promedios en el tiempo en función de la solubilidad de fósforo para la GIBI200 Y GIBI206. Cada gráfica presenta una barra de error correspondiente al 5%.



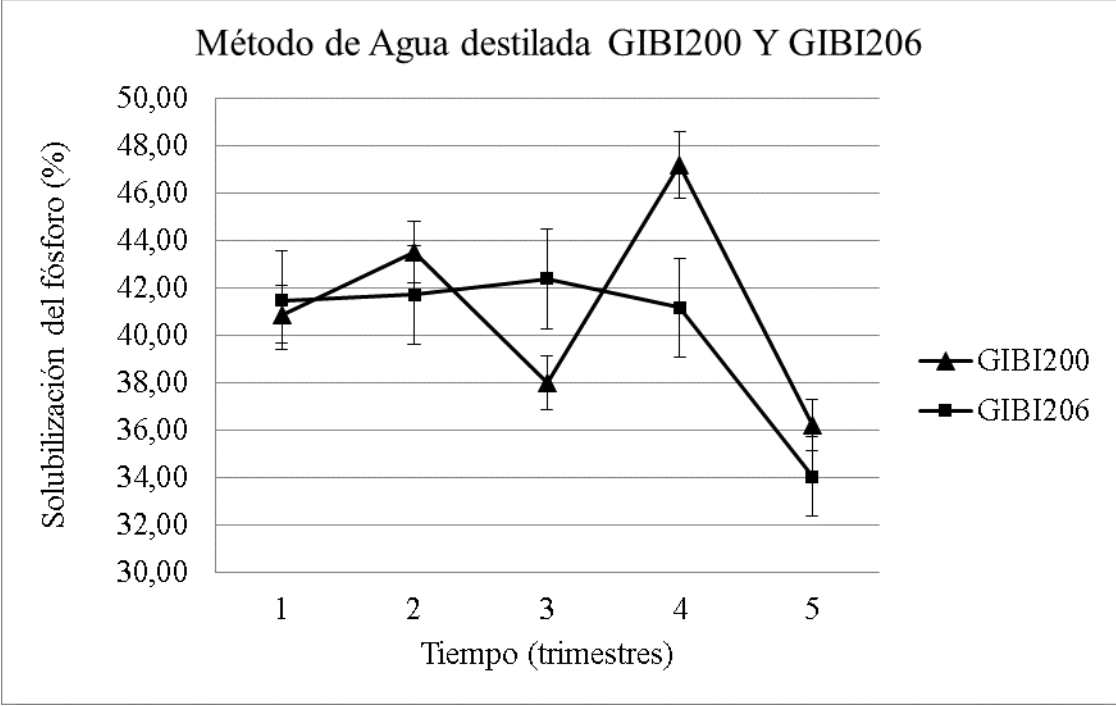
**Figura 17. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de criopreservación**



**Figura 18. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de aceite mineral.**



**Figura 19. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de papel filtro**



**Figura 20. Porcentajes de Solubilidad del fósforo para el método de agua destilada.**

A continuación, en la figura 21, se muestra de manera unificada los métodos de conservación evaluados en función del tiempo para cada una de las cepas estudiadas GIBI200 Y GIBI206.

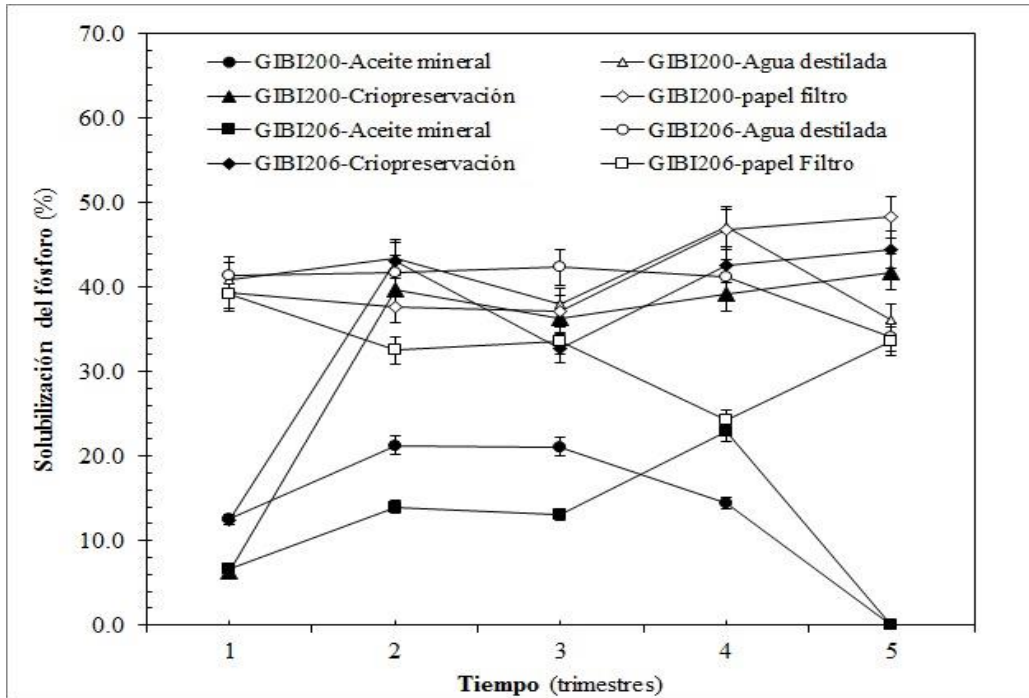


Figura 21. Porcentajes de Solubilidad del fósforo unificados.

### 5.5.1 INDICES DE SOLUBILIZACIÓN DEL FÓSFORO

A continuación, en la tabla 4 se evidencian los índices de solubilización del fósforo y en la figura 22 los resultados dependiendo de la cepa estudiada y los métodos evaluados.

Tabla 4. Índices de solubilidad del fósforo

Índices de solubilización								
T	GIBI200-Aceite mineral	GIBI200-Agua destilada	GIBI200-Criopreservación	GIBI200 -papel filtro	GIBI206-Aceite mineral	GIBI206-Agua destilada	GIBI206-Criopreservación	GIBI206 -papel Filtro
1	19,44	63,52	9,93	61,23	10,41	64,43	19,36	60,81
2	33,06	67,58	61,61	58,44	21,78	64,79	67,06	50,57
3	32,82	59,00	56,54	57,68	20,32	65,86	50,86	52,35
4	22,46	73,34	60,89	72,84	35,57	63,95	66,25	37,75
5	0,00	56,26	64,97	75,04	0,00	52,89	69,12	52,15

T. Tiempo en trimestres

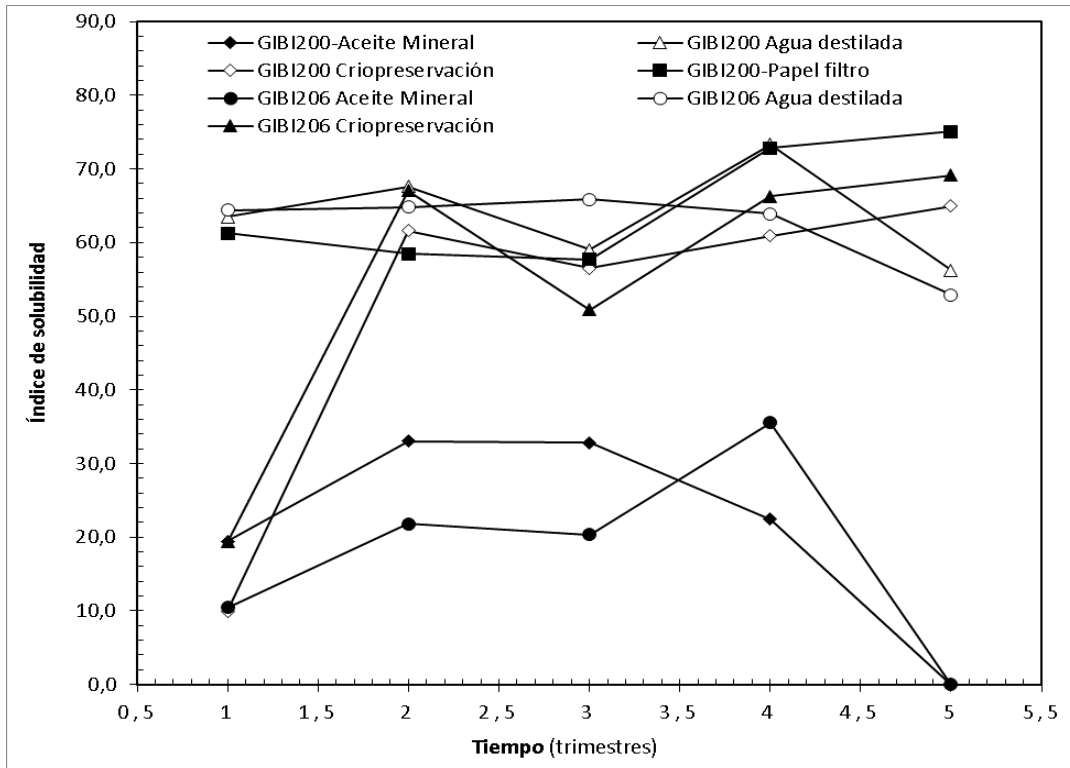


Figura 22. Índices de solubilización unificados

## **6. DISCUSIÓN**

### **6.1 DENSIDAD ÓPTICA**

Como se muestra en la tabla 5, Se escogieron densidades con un promedio de OD<sub>600 nm</sub> 0,9 y 10 obteniendo unas concentraciones estándar de 10<sup>9</sup> células/mL. Esto con el fin de que las alícuotas que se prepararon para cada método de conservación tuvieran la misma concentración de células a conservar y de esta manera garantizar que los recuentos y datos arrojados no tuvieran errores significativos. La cepa GIBI200 obtuvo un promedio de densidad óptica de 0.991± 0,131 y la cepa GIBI206 un promedio de 0.968 ± 0,125, obteniendo así una concentración ideal con la que se inició la conservación.

### **6.2 DISCUSIÓN VIABILIDAD CELULAR**

#### **6.2.1 MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN.**

Existen varios factores que pueden afectar la viabilidad y estabilidad durante el proceso de criopreservación de microorganismos, tales como: senescencia, la velocidad de congelación-descongelación, la temperatura de almacenamiento y el empleo de agentes crioprotectores. Estos compuestos crioprotectores son de gran afinidad por el agua. Estas sustancias protegen de posibles daños que se produzcan en las células microbianas al momento de congelar. Entre los crioprotectores más utilizados se encuentran el glicerol que fue utilizado en esta investigación, dimetilsulfóxido, leche descremada, inositol, sacarosa, glucosa, lactosa. (García M. y Uruburu F, 2001).



Como se evidenció en la sección de antecedentes son pocas las investigaciones reportadas en cuanto a la conservación de la estabilidad genética y bioquímica de cepas como *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*. Sin embargo, algunos investigadores como la de ZdenekHubálek en el 2003, aunque no utilizó glicerol como agente de criopreservación, concluyó que el método de criopreservación garantizó una supervivencia a largo plazo de *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Proteus* y *Micrococcus spp* en tiempos superiores a 16 meses.

Por otra parte, otros autores como Chiellini, C. y colaboradores en el 2016 encontraron que la criopreservación podría preservar hasta 14 meses soluciones estándar microbianas de *Bacillus subtilis*, esto nos da a entender que el método evaluado en este estudio fue acorde con los resultados obtenidos por otros investigadores destacados en investigaciones recientes.

Como se observa en la tabla 7, para la cepa GIBI200, el mayor porcentaje de viabilidad celular en este método de conservación se alcanzó en el trimestre con un 94,44%, podemos observar que a medida que aumenta el tiempo de preservación disminuyen los porcentajes de viabilidad hasta un 69,9% en el trimestre 3. Igualmente se puede observar en la tabla 6 que la cepa GIBI206 presentó el mayor porcentaje de viabilidad del 92,74% en el periodo 1 y terminó en el trimestre 5 con 66,67%.

Estos datos nos dan a entender que el método de criopreservación resulta adecuado y es conveniente para garantizar la viabilidad de bacterias en el tiempo. Este método ha sido utilizado ampliamente por múltiples autores, tales como Rodríguez Peña y Torres Lozano (2006), Pimienta Sandoval y Vergara Ordogoistia (2007) y Salazar G. y col (2011) quienes concluyeron que este método presenta la ventaja de ser accesible en cuanto a recursos económicos y complejidad estando al alcance de laboratorios microbiólogos y de investigación.

Al igual que Huertas y colaboradores en el 2006, podemos afirmar que los métodos de criopreservación a pesar de ser complejos y costosos, presentan los porcentajes más altos de viabilidad, esto, debido a que la reproducibilidad del proceso de congelación es altamente controlada, permitiendo que se conserven las propiedades bioquímicas y genéticas de las cepas y se prolongue la viabilidad por un largo período (años).

### **6.2.2 VIABILIDAD CELULAR EN MÉTODOS DE PRESERVACIÓN CON AGUA DESTILADA.**

Después de corroborar que el mejor método de viabilidad es criopreservación para las dos cepas estudiadas GIBI200 Y GIBI206, pero considerando que este método requiere mayor esfuerzo inicial y equipamiento especializado y muchos laboratorios no lo tienen, el método de conservación en agua destilada presenta porcentajes de viabilidad molecular cercanos a los reportados para criopreservación. En este orden de ideas, se encontró que para la GIBI200 el porcentaje más alto de viabilidad molecular se alcanzó en el primer trimestre con un porcentaje de 96,24% y terminó el quinto trimestre con 56,99%. Esto se evidencia en las tablas 6 y 7.

Para GIBI206 el mayor porcentaje de viabilidad molecular se alcanzó en el primer trimestre con un 91,21% y finalizó el quinto semestre con 43,93%. Estos resultados no fueron acordes a lo reportado en estudios de García y Uruburu en el 2005, donde el método de conservación en agua destilada obtuvo buenos resultados en porcentajes de viabilidad de microorganismos incluso en períodos a veces superiores a cinco años. Sin embargo, podemos destacar que para periodos cortos no superiores a 6 meses, esta técnica podrá ser utilizada por su fácil acceso y bajo costo.

Al igual que García y Uruburu en el 2005, otros autores como Cano en el 2014 y Nakasone en el 2004, establecieron que el agua es un método de conservación con altos porcentajes de viabilidad en conservaciones con más de cinco años, debido a que el agua en el entorno evita cambios bioquímicos y morfológicos, dejando a los microorganismos en un estado de hipobiosis (disminución del metabolismo).

En investigaciones recientes como las relacionadas con Sae-Jin KI y colaboradores en el 2014, establecen que la criopreservación como un área de la criobiología permite dilucidar los efectos de las bajas temperaturas en la vida materiales y sistemas, incluidas proteínas, células organismos completos

### **6.2.3 VIABILIDAD CELULAR EN MÉTODOS DE PRESERVACIÓN CON PAPEL FILTRO**

Los métodos como el papel filtro no presentaron buenos porcentajes de viabilidad para este tipo de cepas en tiempos superiores a dos trimestres, en esta investigación se evidenció que para el primer trimestre la viabilidad de la GIBI200 mostrada en la tabla 7 fue del 94,67% y terminó el quinto trimestre en 8,87%. Por otra parte, GIBI206 mostrada en la tabla 6, presentó el mayor porcentaje de viabilidad en el primer semestre con 92,09% y finalizó al quinto semestre con 11,299%. En este orden de ideas estos métodos de conservación en papel filtro garantizan viabilidad molecular en periodos cortos de tiempo debido a que se caracterizan por reducir el metabolismo de microorganismos aerobios y permiten mantener un sistema hidratado hasta cierto tiempo, este proceso es difícil de controlar en el tiempo, la humedad puede ser un factor decisivo en este método de conservación. Cabe resaltar que el éxito de la preservación de microorganismos no solo depende de la ejecución de cada técnica, sino también de las características fisicoquímicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado

fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo y la concentración de los microorganismos. (García M. y Uruburu F, 2005).

#### **6.2.4 VIABILIDAD CELULAR EN MÉTODOS DE PRESERVACIÓN CON ACEITE MINERAL.**

El método de conservación en aceite mineral ha sido ampliamente utilizado para la conservación de hongos especialmente, pero, es utilizado en bacterias como método a **corto plazo** por el alto riesgo de contaminación y mutación del cultivo (Onions 1971). Investigaciones realizadas por G, cárdenas, (2010) enfatizan que este método no es recomendable para bacterias, como se demostró en las cepas GIBI 200 y GIBI 206 observadas en la figura 5 donde, los cambios que presentaron los microorganismos no fueron tan significativos a los 3 y 6 meses de conservación considerándose evidencias macroscópicas (contextura, forma, modo de crecimiento, superficie, borde, tamaño) en las figuras 15 y 16 se observa que las colonias continúan siendo iguales según las descripciones obtenidas a las 24 horas. Además, la morfología microscópica no varió presentándose *Bacillus* gram positivos en la tinción de gram. Sin embargo, a partir del 3 trimestre (9 meses) las colonias empiezan a presentar un cambio drástico tanto en el aspecto macroscópico cambiando su morfología y presentando un pigmento no propio de estos microorganismos como podemos observar en la morfología macroscópica.

Además, se evidenciaron variaciones microscópicas, observando en la tinción de gram (bacilos y cocos gram positivos) lo que confirma la contaminación del medio.

Para concluir, podemos decir que el método de conservación es viable a un corto plazo máximo de 6 meses para los microorganismos mencionados como se pudo observar. Por tanto, no se recomienda utilizar este método para un periodo mayor, ya que además se puede presentar una

actividad celular que induce a una alternancia de generaciones de tal manera que después de cierto tiempo las células conservadas serán descendientes lejanas de las iniciales (García-López y Uruburu-Fernández, 2000).

### **6.3 SOLUBILIDAD DE FÓSFORO EN MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.**

Una vez realizado el análisis descriptivo del porcentaje de eficiencia de solubilización en cada periodo de medición utilizando las medidas de tendencia central y de dispersión, se pudo observar los siguientes resultados.

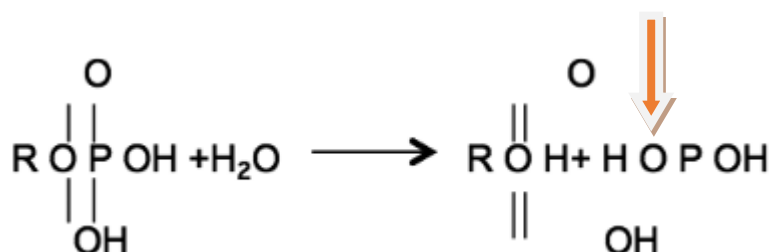
Los microorganismos han demostrado cumplir funciones que mantienen el equilibrio del suelo y apoyan el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos, entre ellos la solubilización de fosfatos, por el cual se logra liberar el ion fosfato accesible para la planta. Este elemento se encuentra limitado en el suelo y es un nutriente vital después del nitrógeno para el desarrollo de la planta. (FAO 2013). **El género *Bacillus* se ha destacado como un potencial solubilizador de fosfato** y puede ser utilizado como biofertilizante que va a permitir obtener un producto agrícola de calidad y sin generar consecuencias al ambiente.

En el estudio de Haike Antelmann et al, en el año 2000, se analizó la respuesta de *Bacillus subtilis* a la necesidad del requerimiento del fosfato, demostrando la inducción de algunos genes reguladores, específicamente el regulon Pho el cual se expresó debido al estrés ambiental, generando proteínas dependientes. Estas proteínas participan en la protección del ADN y de las membranas, además contribuyen en la supervivencia de condiciones ambientales extremas como el calor osmótico y el estrés oxidativo.

Como se evidenció en la sección Metodología, Para evaluar la solubilidad del fósforo se utilizó la Ecuación 2, de esta manera se llegó a obtener los datos necesarios para construir las gráficas mostradas en la sección de resultados en la figura 21 podemos observar que la criopreservación permite mantener las propiedades bioquímicas y genéticas de las cepas GIBI200 y GIBI206 garantizando que de ser empleadas en procesos agrícolas cumplan la función de activar indicadores de fosfato.

En el trabajo realizado por Pragai et al, en 2001, evidenciaron que durante el estrés que produce la limitación de fosfato, bacterias como *Bacillus subtilis* responden activando algunos genes como los del regulon Pho, permitiendo que la célula transporte y utilice el fosfato de manera más eficiente, aumentando de esta manera la accesibilidad de las fuentes de fosfato alternativas.

Los genes del regulón Pho que son inducidos en respuesta son el gen *phoA* y gen *phoB*, los cuales codifican para fosfatasas alcalinas. La descomposición de la materia orgánica en el suelo se logra por acción de las bacterias que liberan el ion ortofostato desde estructuras unidas al carbono como se muestra en la Figura 23.



**Figura 23. Acción de las fosfatasas. Imagen Tomada de Plazas 2010**

En esta investigación se evidenció en las figuras 21, 22 y tabla 8 que el mayor porcentaje de solubilización del fósforo fue en crio preservante para GIBI200 en el quinto trimestre con un porcentaje de 41,81% y un IS de 64.97 mm lo que indica que para este periodo de tiempo se llegó a solubilizar el fósforo con un radio de 0,65 cm en la placa con medio N-BRIP que indica pérdida de células en estos cinco trimestres de conservación. Igualmente, Para GIBI206, el mayor porcentaje de solubilización del fósforo se obtuvo por el método de criopreservación, al quinto semestre se obtuvo un porcentaje valor del 44,48% con un IS de 69,12 mm lo que nos lleva a pensar que la igual que el caso de GIBI200 se llegó a solubilizar el fósforo en un radio bajo, ente caso de 0,69 cm en la placa con medio N-BRIP indicando pérdida de células.

En la figura 21 y tabla 8 podemos observar que para los métodos de Agua destilada tanto para la GIBI200 Y GIBI206 se alcanzaron los mayores porcentajes de solubilización de fosfato al 4 trimestre con valores de 47,20% (IS 73,4) y 41,15% (IS 61,2) respectivamente. Estos datos encontrados son similares a los encontrados para el método de criopreservación lo que puede llevar a pensar que agua destilada es un buen método de conservación de estas cepas dado que en los primeros trimestres a diferencia de criopreservación se mantienen altos porcentajes de solubilidad y que los valores son cercanos teniendo en cuenta la desviación estándar de los datos y las incertidumbres en las mediciones del laboratorio. De igual manera en la tabla 8 y figura 21 se observa que para el método de papel filtro se alcanzaron valores de solubilidad cercanos a los reportados para agua destilada. Los porcentajes de solubilización del fósforo más altos reportados para este método en el estudio de la GIBI200 fue de 66,8% con un IS de 103, 79mm es decir que en el cuarto trimestre llego a solubilizar un radio de 10,3 cm en la placa con medio N-BRIP, siendo uno de los más altos considerando los demás resultados. Para GIBI206 los

porcentajes no fueron favorables al quinto trimestre únicamente se alcanzó un porcentaje de 33,56% lo que no garantiza que hubo pérdida de células. Es decir que para esta cepa no fue efectivo el método de papel filtro.

Finalmente, el método de aceite mineral (figura 21 y tabla 8) presentó los resultados menos favorables, el porcentaje de solubilidad del fósforo máximo alcanzado para GIBI200 fue de 14,45% y para GIBI206 de 22,88% indicando valores de IS bajos en este caso de 22mm y 34mm respectivamente, indicando que los radios de solubilización fueron bajos lo que garantizaría que hubo una pérdida muy alta de células en los meses de monitoreo. Para el quinto trimestre se evidenció pérdida total de células. En este orden de ideas, este método de aceite mineral sería el más desfavorable y menos recomendado en cuanto a la eficiencia de solubilidad del fósforo.

Finalmente, aunque no se alcanzaron los porcentajes reportados por García M. y Uruburu F, en el año 2000 podemos concluir que el mejor método de conservación es criopreservación considerando los resultados obtenidos para viabilidad y solubilización de fosfato. Sin embargo, el método de conservación de agua destilada puede ser una técnica efectiva en cuanto a viabilidad y solubilización de fosfato para periodos cortos de tiempo no superiores a 6 meses.



## 7. CONCLUSIONES

Aunque en los últimos años han sido pocas las investigaciones relacionadas con la conservación de *Bacillus subtilis* GIBI200 y *Bacillus pumilus* GIBI206. Esta investigación logró corroborar resultados de investigaciones recientes en cuanto a métodos de conservación microbiana concluyéndose que el método de criopreservación presenta valores de viabilidad y solubilidad de fósforo superiores al 50%, Sin embargo, el método de conservación en agua destilada puede ser recomendado para periodos inferiores a cinco trimestres donde puede alcanzar porcentajes de viabilidad cercanos al 45% y son mucho más económicos. Aunque algunos datos fueron importantes en cuanto a viabilidad y solubilidad para el método de papel filtro, no alcanza estabilidad de los resultados en función el tiempo.

El método de aceite mineral no fue eficiente para garantizar buenos porcentajes de viabilidad y solubilización del fósforo para *Bacillus subtilis* GIBI200 y *Bacillus pumilus* GIBI206, evidenciando pérdida total de las células en algunos casos.

## 8. RECOMENDACIONES

- Medir el método de conservación a un plazo superior a 15 meses con el fin de evaluar si continúa siendo eficiente en periodos más prolongados.
- En el método de criopreservación utilizar un preservante diferente a glicerol como, por ejemplo, sacarosa al 10 % (ZdenekHubálek et.al 2003) con el fin de evaluar si las células son las mismas al inocularse en otros tipos de preservantes.
- En el método de aceite mineral es importante considerar para futuras investigaciones que los tubos donde se encuentra el microorganismo conservado por el aceite deben estar en un lugar fresco y oscuro para evitar la incidencia de la luz.
- Es importante realizar correctamente el choque térmico 37°C con el fin de reactivar las alícuotas criopreservadas y así poder garantizar la eliminación total del glicerol, ya que una vez descongelado éste se vuelve nocivo para las cepas en tiempos prolongados.
- Para el método de conservación en papel filtro es muy importante desecar muy bien el papel para garantizar la eficiencia del método.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1. Datos generales correspondientes al conteo de colonias por cada método de conservación en las primeras 24 horas y por cada trimestre.

Los datos generales correspondientes al conteo de colonias en las primeras 24 para GIBI200 y GIBI206 por cada trimestre se muestran a continuación en la tabla A1.

**Tabla A1. Conteo de colonias primeras 24 horas GIBI200 Y GIBI206**

Conteo de colonias			
<i>Bacillus subtilis</i> GIBI200			
24 HORAS			
MÉTODO	CAJA	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
CRIO	1	200	112
	2	201	130
	3	248	135
PROMEDIO		<b>216</b>	<b>126</b>
AGUA	1	210	100
	2	189	110
	3	160	140
PROMEDIO		<b>186</b>	<b>113</b>
FILTRO	1	120	110
	2	180	100
	3	208	130
PROMEDIO		<b>169</b>	<b>113</b>
Conteo de colonias			
<i>Bacillus pumilus</i> GIBI206			
24 HORAS			
MÉTODO	CAJA	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
CRIO	1	210	113
	2	213	154
	3	280	136
PROMEDIO		<b>234</b>	<b>134</b>
AGUA	1	219	145
	2	220	123

	3	279	140
<b>PROMEDIO</b>		<b>239</b>	<b>136</b>
<b>FILTRO</b>	1	121	100
	2	200	99
	3	210	102
<b>PROMEDIO</b>		<b>177</b>	<b>100</b>

A Continuación en la tabla A2 se muestran los resultados de los conteos de las colonias de GIBI200 y GIBI206 por cada método y en cada trimestre.

**Tabla A2. Conteo de colonias por trimestre y método de conservación GIBI200**

<b>Conteo de colonias</b>			
<b><i>Bacillus pumilus</i> GIBI206</b>			
<b>1 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	190	100
	2	210	130
	3	250	120
<b>PROMEDIO</b>		<b>217</b>	<b>117</b>
<b>AGUA</b>	1	200	90
	2	199	102
	3	255	130
<b>PROMEDIO</b>		<b>218</b>	<b>107</b>
<b>FILTRO</b>	1	101	85
	2	187	89
	3	203	99
<b>PROMEDIO</b>		<b>163</b>	<b>91</b>
<b>2 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	160	90
	2	180	95
	3	156	94
<b>PROMEDIO</b>		<b>165</b>	<b>93</b>
<b>AGUA</b>	1	126	85
	2	135	89
	3	144	87
<b>PROMEDIO</b>		<b>135</b>	<b>87</b>
<b>FILTRO</b>	1	88	60
	2	76	50
	3	70	46

<b>PROMEDIO</b>	<b>78</b>	<b>52</b>	
<b>3 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	155	88
	2	170	90
	3	155	87
<b>PROMEDIO</b>	<b>160</b>	<b>88</b>	
<b>AGUA</b>	1	115	84
	2	120	87
	3	134	89
<b>PROMEDIO</b>	<b>123</b>	<b>87</b>	
<b>FILTRO</b>	1	50	40
	2	40	30
	3	45	32
<b>PROMEDIO</b>	<b>45</b>	<b>34</b>	
<b>4 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	160	89
	2	165	92
	3	156	90
<b>PROMEDIO</b>	<b>160</b>	<b>90</b>	
<b>AGUA</b>	1	110	80
	2	122	83
	3	150	88
<b>PROMEDIO</b>	<b>127</b>	<b>84</b>	
<b>FILTRO</b>	1	30	25
	2	35	20
	3	25	15
<b>PROMEDIO</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	
<b>5 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	162	90
	2	160	95
	3	145	94
<b>PROMEDIO</b>	<b>156</b>	<b>93</b>	
<b>AGUA</b>	1	100	84
	2	104	85
	3	110	88
<b>PROMEDIO</b>	<b>105</b>	<b>86</b>	
<b>FILTRO</b>	1	20	10
	2	25	10

	3	15	5
<b>PROMEDIO</b>	<b>20</b>	<b>8</b>	

**Tabla A3. Conteo de colonias por trimestre y método de conservación GIBI206**

<b>Conteo de colonias</b>			
<b><i>Bacillus subtilis</i> GIBI200</b>			
<b>1 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	188	99
	2	190	123
	3	234	112
<b>PROMEDIO</b>	<b>204</b>	<b>111</b>	
<b>AGUA</b>	1	198	89
	2	178	100
	3	259	123
<b>PROMEDIO</b>	<b>211</b>	<b>104</b>	
<b>FILTRO</b>	1	100	88
	2	177	91
	3	203	100
<b>PROMEDIO</b>	<b>160</b>	<b>93</b>	
<b>2 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	150	89
	2	181	92
	3	164	94
<b>PROMEDIO</b>	<b>165</b>	<b>92</b>	
<b>AGUA</b>	1	127	86
	2	130	92
	3	143	95
<b>PROMEDIO</b>	<b>133</b>	<b>91</b>	
<b>FILTRO</b>	1	78	59
	2	69	49
	3	70	49
<b>PROMEDIO</b>	<b>72</b>	<b>52</b>	
<b>3 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	170	78
	2	168	88

	3	154	79
<b>PROMEDIO</b>		<b>164</b>	<b>82</b>
<b>AGUA</b>	1	112	80
	2	120	87
	3	132	79
<b>PROMEDIO</b>		<b>121</b>	<b>82</b>
<b>FILTRO</b>	1	45	40
	2	35	25
	3	38	29
<b>PROMEDIO</b>		<b>39</b>	<b>31</b>
<b>4 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	156	86
	2	155	91
	3	143	88
<b>PROMEDIO</b>		<b>151</b>	<b>88</b>
<b>AGUA</b>	1	100	79
	2	131	98
	3	154	87
<b>PROMEDIO</b>		<b>128</b>	<b>88</b>
<b>FILTRO</b>	1	25	25
	2	38	16
	3	38	19
<b>PROMEDIO</b>		<b>34</b>	<b>20</b>
<b>5 TRIMESTRE</b>			
<b>MÉTODO</b>	<b>CAJA</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup></b>
<b>CRIO</b>	1	170	89
	2	165	78
	3	123	88
<b>PROMEDIO</b>		<b>153</b>	<b>85</b>
<b>AGUA</b>	1	98	90
	2	100	76
	3	120	77
<b>PROMEDIO</b>		<b>106</b>	<b>81</b>
<b>FILTRO</b>	1	15	10
	2	15	5
	3	15	5
<b>PROMEDIO</b>		<b>15</b>	<b>7</b>

**ANEXO 2. Resultados de estadística descriptiva para solubilización del fósforo.**

**Tabla A2. Porcentajes de solubilización del fósforo para cada cepa, trimestre y método de conservación evaluado.**

<b>T</b>	<b>GIBI200- Aceite mineral</b>	<b>GIBI200- Agua destilada</b>	<b>GIBI200- Criopreser- vación</b>	<b>GIBI200- papel filtro</b>	<b>GIBI206- Aceite mineral</b>	<b>GIBI206- Agua destilada</b>	<b>GIBI206- Criopreser- vación</b>	<b>GIBI206- papel Filtro</b>
<b>1</b>	12,51	40,88	6,39	39,41	6,70	41,47	12,46	39,14
<b>2</b>	21,27	43,49	39,65	37,61	14,02	41,70	43,16	32,55
<b>3</b>	21,12	37,97	36,39	37,12	13,08	42,38	32,73	33,69
<b>4</b>	14,45	47,20	39,19	46,88	22,89	41,15	42,64	24,29
<b>5</b>	0,00	36,21	41,81	48,29	0,00	34,04	44,48	33,56

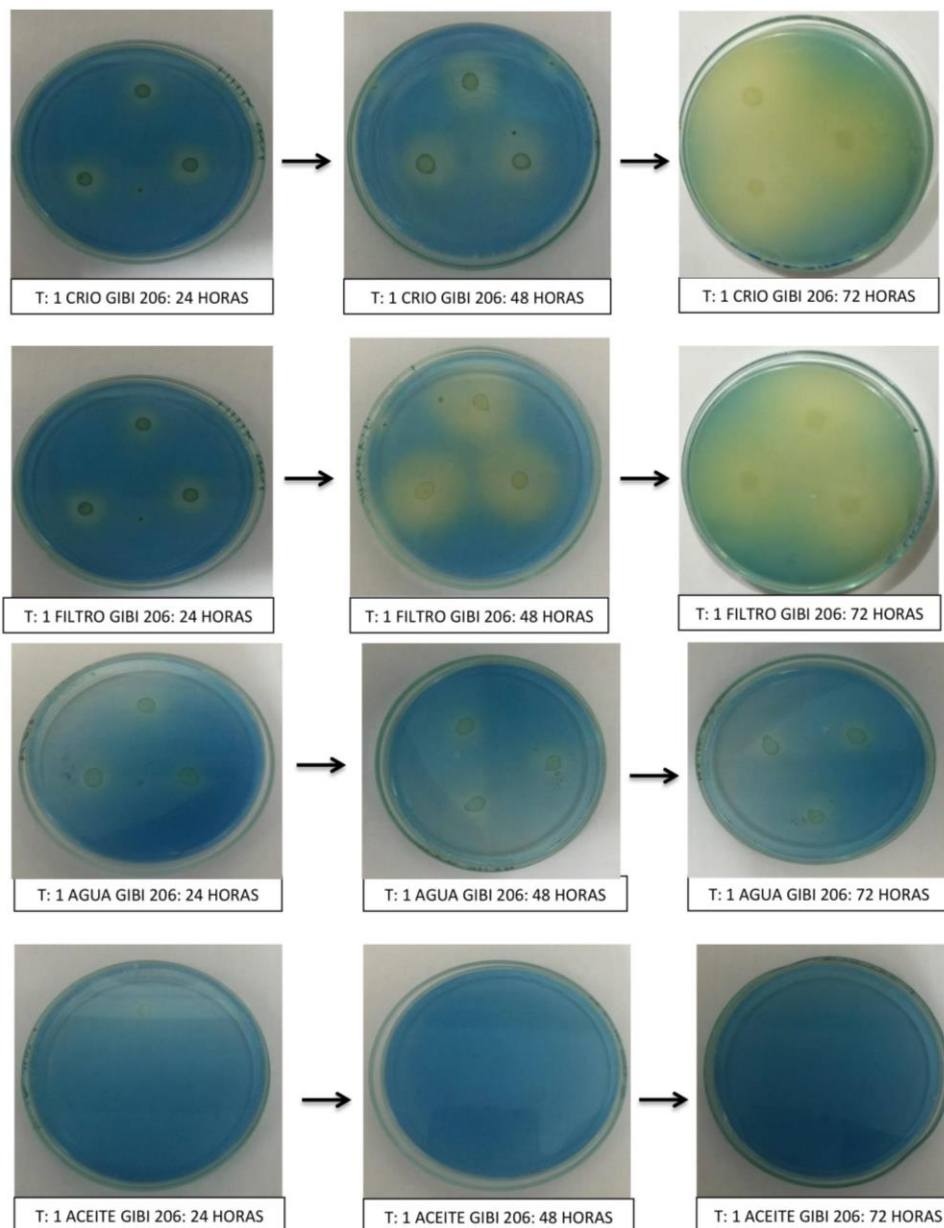
**T corresponde al tiempo en trimestres.**



### ANEXO 3.

#### Prueba de solubilización de fósforo en medio N-BRIP

Figura A2. Prueba de solubilización de fósforo en medio N-BRIP, cepa GIBI206. Se observa la solubilización de fosforo de cada una de las siembras (3 colonias) en cada placa y los halos que forman dependiendo del tiempo de incubación (24, 48, 72 horas) por cada método de conservación para el Trimestre 1 (T: 1). De esta manera se realizó para cada cepa GIBI200 Y GIBI206 en cada trimestre (T 1,2,3,4, y 5).



**ANEXO 4.**  
**Tablas de densidades ópticas**

<b>DENSIDAD ÓPTICA</b>				
	<b>GIBI200</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>GIB206</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	0,123	±0,15	0,923	±0,2
<b>2</b>	1,401	±0,20	1,408	±0,1
<b>3</b>	0,724	±0,07	0,844	±0,06
<b>4</b>	0,91	±0,18	1,028	±0,1
<b>5</b>	1,441	±0,17	1,161	±0,15
<b>6</b>	0,952	±0,2	1,002	±0,1
<b>7</b>	0,9	±0,11	0,954	±0,2
<b>8</b>	1,023	±0,1	0,895	±0,1
<b>9</b>	0,954	±0,1	0,983	±0,1
<b>10</b>	1,501	±0,1	0,733	±0,09
<b>11</b>	0,87	±0,12	0,892	±0,1
<b>12</b>	1,099	±0,1	0,798	±0,2
<b>Promedio</b>	0,9915	±0,131	0,968	±0,125

## ANEXO 5. Pruebas Estadísticas

### Estadísticas descriptivas GIBI200

<b>Periodo 1</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	0.900	6.39	4.339	67.930	11.88
<b>Agua</b>	30.570	40.880	5.712	13.974	48.590
<b>Papel filtro</b>	18.570	39.410	21.272	21.272	47.510
<b>Aceite mineral</b>	0.900	12.513	7.233	57.807	21.276
<b>Periodo 2</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	25.060	39.65	8.938	22.543	54.24
<b>Agua</b>	28.390	43.490	13.077	30.067	66.340
<b>Papel filtro</b>	19.340	37.610	7.945	21.125	45.700
<b>Aceite mineral</b>	4.721	21.275	6.828	32.098	28.387
<b>Periodo 3</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	28.390	36.39	3.385	9.304	44.39
<b>Agua</b>	19.890	37.970	7.697	20.271	46.460
<b>Papel filtro</b>	18.570	37.120	9.791	26.378	47.340
<b>Aceite mineral</b>	0.819	21.122	10.475	49.595	34.693
<b>Periodo 4</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	29,18	39.19	18.453	18.467	49.2
<b>Agua</b>	43.480	47.200	3.207	6.795	55.160
<b>Papel filtro</b>	63.890	66.880	2.069	3.094	69.760

<b>Aceite mineral</b>	0.000	14.450	15.637	108.193	38.590
<b>Periodo 5</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	51.430	41.81	3.349	5.600	32.19
<b>Agua</b>	65.710	36.210	5.502	15.197	43.480
<b>Papel filtro</b>	47.260	48.290	0.794	1.645	49.510
<b>Aceite mineral</b>	0	0	.	.	0

### Estadísticas descriptivas GIBI206

<b>Periodo 1</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	4.348	12.46	5.904	52.749	20.898
<b>Agua</b>	29.030	41.470	7.142	17.223	46.600
<b>Papel filtro</b>	31.030	39.140	5.713	14.599	44.440
<b>Aceite mineral</b>	14.830	15.080	0.225	1.492	15.270
<b>Periodo 2</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	28.890	43.16	5.863	15.556	58.250
<b>Agua</b>	28.800	41.700	8.594	20.611	50.910
<b>Papel filtro</b>	25.830	36.990	6.679	18.056	47.790
<b>Aceite mineral</b>	0	4.365	7.469	171.133	16.105
<b>Periodo 3</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	20.830	32.73	8.428	24.204	44.63
<b>Agua</b>	31.680	42.380	7.414	17.494	50.250
<b>Papel filtro</b>	26.070	39.340	7.046	17.910	45.000
<b>Aceite mineral</b>	0	8.433	11.913	141.275	32.895

<b>Periodo 4</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	40.680	42.64	7.311	14.438	44.60
<b>Agua</b>	20.200	41.150	16.223	39.419	64.050
<b>Papel filtro</b>	20.250	24.290	3.750	15.441	30.200
<b>Aceite mineral</b>	28.890	34.020	4.639	13.635	40.430
<b>Periodo 5</b>					
<b>Método</b>	<b>Mín.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Coef. Var (%)</b>	<b>Máx.</b>
<b>Crío</b>	39.880	44.48	4.080	9.173	49.08
<b>Agua</b>	30.670	37.940	3.822	10.074	41.180
<b>Papel filtro</b>	21.210	36.030	9.090	25.229	41.620
<b>Aceite mineral</b>	0	0	.	.	0

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Vibha B, Neelam G. July (2012). Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. Department of Microbiology, Vol. 1(3), 78-83.

Becerra, C. F., Lima, R. F., Lazera, M. S., Wanke, B., Borba, C. M. 2006. Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol 39 (3):,241-244.

Nakasone, K. K., Peterson, S. W., Jong, S-C. 2004. Preservation and distribution of Fungal cultures. *Biodiversity of Fungi*, vol (2), 37-47.

WSI Consultoría Digital. Elección de la técnica adecuada. Metrix Laboratorios (2015) doi: <http://www.metrixlab.mx/no-cat/preservacion-de-microorganismos/>

García MD, Uruburu F. (2005). La conservación de cepas microbianas. *Act SEM*, vol (30), 12-6.  
Vibha B, Neelam G. (July 2012). Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. Department of Microbiology, Kurukshetra University, vol. 1(3), 78-83.

Weng Z. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Infanta 1158 e/ Llinás y Clavel, vol 2(3), 68-73.

Pérez J, Casas M, Beltrán C. (2011). Conservación de bacterias por el método de suspensión en agua destilada estéril. Instituto Nacional de Investigaciones de la caña de azúcar (INICA). vol 1 (2), 06-10.

Bashan, Y. y Holguin, G. (1998). Proposal for the division of Plant Growth Promoting Rhizobacteria into two classification: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem*, vol. 30 (8-9), 1225-1228.

Matiru, V. N. y Dakora, F. (2004). Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, vol (3), 1-7.

Mueller, U.G., & Wolfenbager, L, L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(10), 389-394.

4.

Bashan, Y. y Holguin, G. Proposal for the division of Plant Growth Promoting Rhizobacteria into two classification: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem., 1998, vol. 30 (8-9), 1225-1228.

Martín, C., Cervera, M.T. & González-Benito, M. E. (2011). Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation-dehydration cryopreservation protocol. Journal of Plant Physiology, 168(2), 158-166.

Uzunova, T., & Donev, T. (2004) ANABIOSIS AND CONSERVATION OF MICROORGANISMS. JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS, vol (2), 417-28.

García de Salamone, I.E., J. Dobereiner, S. Urquiaga, y R.M. Boddey. (1996). Biological Nitrogen Fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. Biol. & Fertil. (23), 249-256.

Döbereiner, J. y J.M. Day. (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. International Biological Prog, vol (2), 39-56.

Rodríguez M., M.N. (1995). Microorganismos libres fijadores de nitrógeno, vol (2), 105-126.

Ferrera-Cerrato R. y J. Pérez M. (1996). Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados, vol (21)(1), 82-89.

Kloepper, J. W. (1993). Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. F, vol (5), 1993. 274

Priest FG (1993). Systematics and Ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, vol (4), 3-16.

Kempf, MJ; Chen, F; Kern, R; Venkateswaran, K (June 2005). Recurrent isolation of hydrogen peroxide-resistant spores of *Bacillus pumilus* from a spacecraft assembly facility, vol (2), 150-154.

Jump up Hill, J E; Baiano, J C F; Barnes, A C (1 December 2009). "Isolation of a novel strain of "B. pumilus" from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens."

National Center for Biotechnology Information. (2008). *Bacillus pumilus*: A ubiquitous soil organism [Data file]. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=bacillus%20pumilus>.

Hendrick C a, Johnson LK, Tomes NJ, Smiley BK, Price JP. (1991). Insertion of Tn916 into *Bacillus pumilus* plasmid pMGD302 and evidence for plasmid transfer by conjugation. *Plasmid*, vol 26(1), 1-9.

Pan J, Huang Q, Zhang Y. (2004). Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current microbiology*, vol 49(3), 165-190.

Benardini JN; Sawyer J; Venkateswaran K, & Nicholson WL. (2003). Spore UV and acceleration resistance of endolithic *Bacillus pumilus* and *B. subtilis* isolates obtained from Sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia. *Astrobiology*, vol (3), 709-717.

Dickinson DN, La Duc MT, Satomi M, Winefordner JD, Powell DH, & Venkateswaran K. (2004). MALDI TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores. *J Microbiol Methods*, vol (58), 1-12.

Kempf MJ, Quigley MS, Chen F, Satomi M, Kern R, & Venkateswaran K. (2005). Isolation and characterization of hydrogen peroxide resistant spores of *Bacillus pumilus* from a Spacecraft Assembly Facility. *Astrobiology*, (3), 391-405.

Aliye N, Fininsa C, Hiskias Y. (2008). Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*, vol (47), 282–288.

Basurto, M. G.; M. I. font; J. García; M. Vásquez. (2010). Cambios en la estructura celular durante la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioide*. *Acta Microscópica*, vol 19(2), 138-144.

Carreras, B. (2007). Aislamiento y determinación de las características morfológicas, moleculares y patogénicas de cepas nativas de la Bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner con potencial para el control de plaga, tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Biológicas.

Edwards M. (2008). *Bacterial physiology: a molecular approach*. Ed. El-SharoudSpringer-Verlag Berlin Hiedelberg, vol (2), 120-126.



- Kamysz E, Mickiewicz B, Kamysz W, Bielińska S, Rodziewicz-Motowidło S, Ciarkowski J. Synthesis. (2010). Biological activity and solution structure of new analogues of the antimicrobial Gramicidin, vol (3), 57-62.
- Vogt TC, Schinzel S, Bechinger B. (2011). Biosynthesis of isotopically labeled gramicidins and tyrocidins by *Bacillus brevis*. J Biomol NMR, vol 26(1), 1-11.
- Shah, S.; Li, J.; Moffatt, B. A. y Glick, B. R. (1998). Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, vol (44), 833-843.
- Holguín, G. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. Agricultura Técnica en México, vol (29), 201-211.
- Venegas E, Ciampi L., Collado L., Costa M., Fuentes R., Nissen J., Schobitz R., Schoebitz M. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *bacillus cohn* antagonistas de cepas patógenas de fusarium. Agro sur, vol (33), 1-12.
- Wei YH, Wang LC, Chen WC, Chen SY. (2011). Production and Characterization of Fengycin by Indigenous *Bacillus subtilis*. Originating from a Potato Farm., vol (11), 4526-38.
- Devendra K, Bhavdish J. (2011). Interactions of *Bacillus spp.* and plants With special reference to induced systemic resistance. Microbiological Research, vol (164), 493-513.
- Nam MH, Park MS, Kim HG, Yoo SJ. (2009). Biological control of strawberry Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. J Microbiol Biotechnol, vol(3),140-155.
- Abous A, Cherif A, Daffonchio D. (2009). Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. J Basic Microbiol, vol (49), 293 – 303.
- Ortega-Morales BO, Ortega-Morales FN, Lara-Reyna J, De la RosaGarcía SC, Martínez-
- Hernández A, Montero-M J. (2000). Antagonism of *Bacillus spp.* isolated from marine biofilms against terrestrial phytopathogenic fungi. Mar Biotechnol (NY), vol (4), 160-172.
- Pryor SW, Gibson DM, Hay AG, Gossett JM, Walker LP. (2010). Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during the solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. Appl Biochem Biotechnol, vol (20), 130-132.

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). Situación alimentaria mundial. Nota informativa de la FAO.2013

Corrales L, Sánchez L. *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. NOVA [En línea] 2011[Fecha de acceso 3 de Mayo de [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA16\\_ARTREVIS1\\_BACILLUS.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA16_ARTREVIS1_BACILLUS.pdf)

Pragai Z, Harwood Colin R. Regulatory interactions between the Pho and  $\delta$ B-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. Microbiology [En línea] 2002 [ Fecha de acceso 26 de Mayo de 2013]. URL Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988534>.

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances, 16(4), 729-770.

Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F., & Bonilla Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero greenhouse conditions. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 3(7), 1401–1415.

Duque, E., Rodríguez-andrade, O., Torre, J. De, Jesús, R. P., Edificio, J., Universitaria, C. México, C. P. (2010). Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. Bio Tecnología, 14(2).

García, D., Fern, F. U., Tipo, C., En, C., & Aquellos, C. (2008). Temas de actualidad de la conservación de cepas microbianas. SEM, 12–16.

ARAI, Yuji and SPARKS, Donald. Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. In: Advances in Agronomy, 2007, vol. 94, p. 135-179.

GOJON, Alain; NACRY, Philippe and DAVIDIAN, Jean Claude. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. In: Current Opinion in Plant Sciences, 2009, vol. 12. p. 328-338.

Martínez, A., León, M., & González, G. (2009). Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril. ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar, XLIII(2), 47–50. Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=223120662007>.

Bueno, L., & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*, 5, 166–168. Retrieved from <http://reviberoammicol.com/1998-15/166168.pdf>.

Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F., & Bonilla Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401–1415.

Cárdenas, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* rifai. *Fitosanidad*, 14(3), 189–195.

Onions, A. H. S. (1971). In *Methods in Microbiology* (c. Booth, de), Volume 4, 113-151.

Academic Press, New York. In Kirsop and Doyle A. *Maintenance of Microorganisms and Cultured*, Volumen 2. 123-234

*Cells. A Manual of Laboratory Methods* Academic Press. London. p.23.

García, M. D.; F. Uruburu: «La conservación de cepas microbianas. Colección Microbiana de Cultivos Tipo (CECT) ,(2000) Universidad de Valencia, Act SEM; 30:12-6.

Kumar, V. Narula, N. (1999) Solubilization of organic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococum mutans*. *Boil. Fertile. Solis*.28. 301-305

Árgel Gastelum-Arellanez, Octavio Paredes-López, Víctor Olalde-Portugal. (2014) Extracellular endoglucanase activity from *Paenibacillus polymyxa* BEb-40: production, optimization and enzymatic characterization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 30(11):2953-2965.

González F, Fuentes N. Action mechanism of five microorganism promoters of plan growth (2017) *REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS*, Volumen 34(1):17-3

Castañeda E, Sánchez L. Evaluation of growth of four species of the genus *Bacillus* sp., the first step to understand their biocontrol effect on *Fusarium* sp. (2016) *Nova* vol.14 no.26 1794-2470

Öztürk S, Çalık P, Özdamar TH. Fed-Batch Biomolecule Production by *Bacillus subtilis*: A State of the Art Review. (2016) *Trends Biotechnol.*;34(4):329–45

Rekha K, Baskar B, Srinath S, Usha B. Plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* RR4 isolated from rice rhizosphere induces malic acid biosynthesis in rice roots. Rekha K, Baskar B, Srinath S, Usha B. *Canadian Journal of Microbiology*, 20-27.

García, M.y Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM, 30, 12-16

P.H. Calcott, T.J. Calvert Cryoprotective action of nonionic detergents on *Bacillus subtilis* and bovine red blood cells (1978), FEMS Microbiol. Lett., 4 pp. 211-215

Kloepper J W, Schroth M N. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. (1981) Phytopathol. 71:1020–1024.

Gray E J, Smith D L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. (2005) Soil Biol. Biochem. 37: 395–412

Tunali S, Cabuk A, Akar T. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. Chem. Engineer. J(2006)115(3): 203–211

Davis D.B. Dulbecco, N.H. y Ginsberg, H.S. Tratado de Microbiología 4ª ed. (1997) Editorial Masson

Torriente, D. (2010). Revisión bibliográfica APLICACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR. PERSPECTIVAS DE SU USO EN CUBA. Cultivos Tropicales, 31(1), 19–26.

Rodríguez H, Fraga R, González T, Bashan Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil 287:15–21

Datta M, Palit R, Sengupta C, Kumar M, Banerjee S.(2011). Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of Chilli (*Capsicum annum* L.) under field conditions. Australian Journal of Crop Science 5:531–536.

García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca, 3, 173–186.

Loredo-osti, C. (2016). Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Gramineous Species : A Review. Researchgate, (January), 225–235.

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

Beltrán M. (2009). Evaluación del efecto del sistema de producción del cultivo del arroz (secano e inundado) sobre la población microbiana y la actividad enzimática asociada al metabolismo edáfico del fósforo (tesis de Maestría en Ciencias- Microbiología). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Beltrán P, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, 15(1), 101–113.

Sylvia M, Fuhrmann J, Hartel P, Zuberer D. (1995). Principles and applications on soil microbiology. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey.640p

Banik S, Dey B. (1983). Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*. 69: 353-364.

Vera D, Valencia H, Pérez H. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata*, myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana* 7(1):33-40

Moratto C, Martínez L, Valencia H, Sánchez J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía colombiana* 23(2): 299-309.

Torres M, Lizarazo L. (2006). Evaluación de grupos funcionales (C,N,P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá, Colombia. *Agronomía Colombiana* 24(2): 317- 325

De Freitas J, Banerjee M, Germida J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.) *Biology Fertility Soils* 24: 358–364

Guang-Can T, Shu-tun T, Miao-Ying C, Guang-hui. (2008). Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere* 18(4):515-523

Moreno N, Moreno L, Uribe D. (2007). Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. En: Izaguirre Mayoral M, Labandera C, Sanjuán J. (eds.) Biofertilizantes en Iberoamérica: Visión técnica, Científica y Empresarial vol. 1. Denad Internacional, Montevideo, p 38–45.

Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil. Biol. Biochem.* 37:1970–1974.

Chen Y, Rekha A, Arun A, Shen F, Lai W, Young C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33–41

Oliviera C, Alves V, Marriel I, Gómez E, Scotti M, Carneiro M, Guimaraes M, Schaffert R, Sa N. (2008). Biofertilizantes en Iberoamérica: Visión técnica, Científica y Empresarial vol. 1. Denad Intern. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil. Biol. Biochem.* 41: 1782-1787