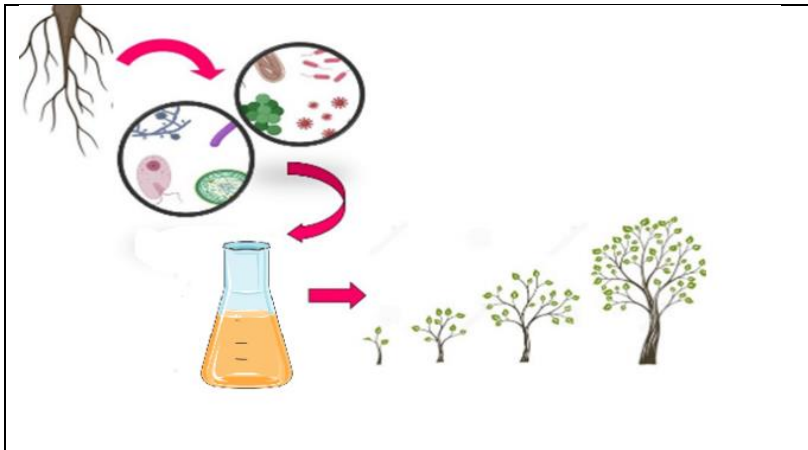


Evaluación de biofertilizante líquido de rizobacterias con crioprotectores celulares para la formulación de un inoculante biológico con aplicación en restauración ecológica

Evaluation of liquid rhizobacteria biofertilizer with cellular cryoprotectants for the formulation of a biological inoculant with application in ecological restoration

Graphical Abstract (GA)



Bacterias promotoras de crecimiento vegetal extraídas del suelo y la raíz de las plantas para producir un inoculante biológico para restauración ecológica

Evaluación de biofertilizante líquido de rizobacterias con crioprotectores celulares para la formulación de un inoculante biológico con aplicación en restauración ecológica

Evaluation of liquid rhizobacteria biofertilizer with cellular cryoprotectants for the formulation of a biological inoculant with application in ecological restoration

Paula Andrea Beltran Jiménez*

*Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño

Dirigido por: Carolina Jaime Rodriguez MSc

RESUMEN

En esta investigación se desarrollaron nuevas formulaciones de un inoculante biológico a partir de PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) con bacterias *Lactobacillus casei*, *Pseudomona Fluorescens* y *Azotobacter* sp con biomateriales realizando ensayos *in vitro* para mejorar el tiempo de vida útil de la formulación para un posterior uso en campo a escala vivero, mejorando las condiciones de adaptación de especies vegetales utilizadas en restauración ecológica. En esta investigación se activaron de cepas bacterianas que han sido previamente aisladas, identificadas y conservadas, se determinó la viabilidad y pureza bacteriana con identificación macroscópica y microscópica. Por último, la producción de inóculos se realizó por fermentación líquida a escala de 200 ml con seguimiento de curvas de crecimiento y ensayos de estabilidad. Se obtuvieron cepas microbianas viables y puras en tres formulaciones distintas con alginato de sodio, glicerol y carboximetilcelulosa por cinco meses a temperatura ambiente, teniendo tres prototipos líquido TRL6 sin producción de gas, con recuento bacteriano

de hasta 1×10^7 UFC/ml. Se logró aportar al conocimiento científico, planteando una nueva fórmula biológica que permita mejorar la nutrición de los suelos degradados, y proponer alternativas para la restauración ecológica de ecosistemas de bosque alto andino.

Palabras claves: rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, crioprotectores, *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp*

Abstract

In this research, new formulations of a biological inoculant were developed from PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) with *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas Fluorescens* and *Azotobacter sp* bacteria with biomaterials, performing in vitro tests to improve the useful life of the formulation for a later use in the field at a nursery scale, improving the adaptation conditions of plant species used in ecological restoration. In this investigation, bacterial strains that have been previously isolated, identified and preserved were activated, bacterial viability and purity were determined with macroscopic and microscopic identification. Finally, the production of inocula was carried out by liquid fermentation at a 200 ml scale with follow-up of growth curves and stability tests. Viable and pure microbial strains were obtained in three different formulations with sodium alginate, glycerol and carboxymethylcellulose for five months at room temperature, having three TRL6 liquid prototypes without gas production, with bacterial counts of up to 1×10^7 CFU / ml. It was possible to contribute to scientific knowledge, proposing a new biological formula that allows improving the nutrition of degraded soils, and proposing alternatives for the ecological restoration of high Andean forest ecosystems.

Keywords: plant growth promoting rhizobacteria, cryoprotectants, *Lactobacillus casei*, *Pseudomona fluorescens*, *Azotobacter sp.*

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques altos andinos Colombianos son ecosistemas estratégicos que brindan funciones ecológicas importantes como: ayudar a reducir las sequias e inundaciones, la reducción de gases efecto invernadero, regulando el cambio climático y el suministro de agua. En los Bosques Andinos se estima una cobertura de 32% (1.210.000 m²) para 1990 y de 18% (~530.000 m²) para 2015, con una tasa de pérdida de ~21.200 m² ha anuales (Bokkestijn, 2017). En Colombia, desde los años noventa la restauración ecológica ha tomado impulso y se han definido varias leyes y normativa para la recuperación y la rehabilitación de ecosistemas disturbados por actividades antrópicas o naturales (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2015). En el año 1998 se implementó el conocido “Plan verde”, que tenía como objetivo identificar zonas de prioridad y desarrollar prototipos de restauración en los manglares y áreas afectadas por minería del sector hidroeléctrico, incorporando la silvicultura (Murcia & Guariguata, 2014).

A nivel experimental, los proyectos de restauración y conservación de plantas nativas tiene inconvenientes con la propagación de sus semillas, la germinación y establecimiento de plántulas, por su lento crecimiento y aún más por la dispersión de estas en sitios seguros ya que son predadas o tienen dificultad para adaptarse al ecosistema (Acero Nitola & Cortés Pérez, 2014) por lo que se considera iniciar el proceso de restauración a escala vivero utilizando biofertilizantes líquidos. Estos bioproductos tienen como fuente principal fitoestimulantes (fitohormonas) a partir de las denominadas rizobacterias promotoras de

crecimiento vegetal (en inglés, plant growth promoting rhizobacteria - PGPR), las cuales se pueden utilizar de manera multifuncional, es decir, tener la capacidad de secretar fitohormonas, fijar nitrógeno, solubilizar nitrógeno, solubilizador hierro y fosforo entre otros (Barajas, 2017); como se evidencia en un estudio en Chile (Angulo et al., 2014a) donde aislaron rizobacterias del género *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus* de una de las plantas nativas más cultivadas del sur de este país, la *Eucalyptus nitens*, allí evaluaron estas bacterias en la misma planta y obtuvieron resultados máximos del crecimiento de esta planta, concluyendo que estos microorganismos tiene un potencial promotor de crecimiento por sus múltiples mecanismos de acción (Angulo et al., 2014b). De igual manera la planta nativa *Eucalyptus camaldulensis* en Australia se siembra principalmente para producción de papel y realizaron un estudio para aumentar la propagación vegetativa con el uso de *Azotobacter chroococcum* y obtuvieron resultados positivos con un mayor proliferación y crecimiento de raíces en ensayos *in vitro* (Karthikeyan & Sakthivel, 2011).

Uno de los usos más importantes de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal es en biofertilizantes; para producir un biofertilizante a partir de PGPR es necesario realizar varias formulaciones para mejorar la estabilidad y viabilidad en condiciones de temperatura ambiente; la mayoría de los inoculantes biológicos de uso comercial para la agricultura tienen agentes crioprotectores que tienen como función mantener la funcionabilidad celular y la viabilidad de material biológico a temperaturas altas como bajas (Pérez Castillo et al., 2016).

Una formulación líquida es idónea, ya que tiene ventajas en lo que respecta en la facilidad de preparación y manejo, además de facilidad en verificar la pureza. Existen varios compuestos orgánicos que han sido estudiados para la protección de los microorganismos que componen

un inoculante biológico, los cuales son adicionados con el fin de prolongar una mayor adherencia del mismo a la semilla, el producto se estabiliza e inactiva las toxinas solubles sobre la cubierta de la semilla y así mismo, aumenta la supervivencia de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) después de la exposición a las condiciones ambientales. Las formulaciones líquidas tiene facilidad de aspersion a las semillas y las plantas, mostrando mejor rendimiento en cultivos agrícolas, accesibles para los pequeños productores, debido a que se emplean materiales de bajo costo (Biradar, 2018).

En otro estudio se formuló y evaluó la vida útil de biofertilizantes líquidos con diferentes crioprotectores celulares, en este caso fueron goma arábica (GA 0.5%), polivinilpirrolidona (PVP 0.5%), glicerol (0.5%), polietilenglicol (PEG 0.5%), y alginato de sodio (SA 0,1%); usaron como control caldo solo con bacterias *Bacillus megaterium*, *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter*; concluyeron que a los 180 días las formulaciones líquidas que evidenciaron mayor tiempo de vida en orden PVP > glicerol > PEG > GA > SA y en el caso de solo caldo no podían mantenerse más de 150 días (Santhosh, 2015). Por otro lado, se evaluó *Pseudomonas fluorescens* a diferentes formulaciones con aditivos poliméricos como polivinilpirrolidona (PVP, 2%), polietilenglicol (PEG, 1%), goma arábica (0,8%) y alginato de sodio (0,1%); adyuvantes y tensoactivo Tween-20 (0,5%); concluyeron que el mejor protector celular fue PVP, seguido de PEG, goma arábica y alginato de sodio, respectivamente; como adyuvante se utilizó goma xantana y el tween 20 los cuales mejoraron los estudios de vida útil hasta de 90 días de almacenamiento (Biradar, 2018).

En la actualidad glicerol o también llamado glicerina se obtiene a partir de biodiesel alrededor de un 70% a nivel mundial (De & Oleagionosa, 2018) y tiene diferentes usos, como ser fuente

de energía para sintetizar y producir productos químicos mediante el uso de microorganismos, como fuente de carbono para la fijación de nitrógeno al suelo (Lafuente Aranda, 2017). La adición de glicerol al suelo estimula la supervivencia de bacterias fijadoras de nitrógeno como las bacterias del género *Rhizobium* contribuyendo a la sostenibilidad agrícola (Generales et al., 2016); de igual manera el glicerol originado a partir de la producción de biodiesel, aumentó la fertilidad y el crecimiento de las plantas Canola (*Brassica napus L*) y trigo (*Triticum aestivum*) en los suelos de Saskatchewan en Canadá. Después de cinco semanas aumentó el carbono orgánico del suelo pero se requirió como complemento es uso de fertilizante para la retención de nutrientes por microorganismos (Qian et al., 2011).

La capacidad nutritiva del suelo se ha perdido por el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, deforestación y expansión agrícola, erosión, lixiviación de nutrientes y contaminación (de Blécourt et al., 2019; Jiang et al., 2020). Adicional, en la agricultura ecológica se requieren de prácticas y procedimientos amigables con el medio ambiente a través del uso de biofertilizantes. Estos han sido probados con éxito en cultivos agrícolas pero han sido escasos los estudios de promoción de crecimiento de PGPR en plantas nativas del bosque alto andino. La fisiología de las plantas nativas usadas para crear núcleos de regeneración requiere de prácticas adecuadas en la zona de vivero que aseguren los procesos de lignificación y sobrevivencia posterior en los suelos degradados. Los biofertilizantes contienen como ingrediente activo diferentes microorganismos PGPR, que pueden ser producidos por fermentación líquida en cultivos *in vitro*. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal requieren un proceso de conservación que permitan mantener sus características bioquímicas, genéticas estables en un periodo de tiempo, diferentes técnicas

como la congelación a muy baja temperatura con crioprotectantes como el glicerol, permiten conservar bacterias. Luego en los procesos de activación de las cepas se utilizan medios líquidos que facilitan el intercambio molecular iónico y se restituya la actividad bioquímica de la membrana rápidamente (Leal & Ramírez, 2005). En el proceso de descongelación, dicho estrés debe ser mitigado para que la bacteria logre recuperarse. Para un óptimo crecimiento de microorganismos es necesario aportarles un medio de cultivo con un mínimo de nutrientes: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, agua y sales minerales necesarios para su metabolismo con propiedades fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. La variedad metabólica de estos microorganismos es tan grande como la de los medios de cultivo, tanto así que existen medios de cultivo selectivos y no selectivos (Barrero Cuevas, 2009; Bonnet et al., 2020).

Una vez se logra obtener un medio de cultivo adecuado la identificación microbiológica de las bacterias se utilizan técnicas microbiológicas para diferenciar las colonias de acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas que permite el aislamiento del microorganismo y evaluación de su crecimiento e identificación bioquímica (Bou et al., 2011). La determinación de la viabilidad se realiza a partir de la visualización del crecimiento de colonias en el medio de cultivo como una primera descripción de las características de los cultivos, y observación de características microscópicas por coloración de Gram para las bacterias ya que es un método diferencial que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas (Esaú López-Jácome et al., 2014) para describir y determinar la morfología a partir de la tinción por observación microscópica (Martha Alfonso González et al., 2015).

En este trabajo de investigación se utilizaron tres cepas, que fueron previamente caracterizadas y evaluadas a escala de vivero sin crioprotectantes. En varios estudios realizados en la Universidad Antonio Nariño sede Usme en el periodo 2018-2020, se inocularon plantas nativas de bosque alto andino como *Escallonia paniculata* y *Vallea Stipularis* (Romero *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2018; Avendaño *et al.*, 2018., Jaime C, 2018), *Bacharis bogotensis* (Antia J, de los Ángeles C y Jaime C, 2017), *Carica cundinamarquensis* (Jaime C *et al.*, 2019). A partir de un banco de cepas obtenido de los estudios anteriores de rizobacterias aisladas de suelos de bosque alto andino, se seleccionaron únicamente tres cepas reconocidas por su capacidad de promoción de crecimiento en las plantas evaluadas, para los ensayos de encapsulación para mejorar la estabilidad de las PGPR a temperatura ambiente. Estas son: *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter sp.*

El carácter innovador del proyecto consiste en desarrollar un producto biotecnológico para mejorar las condiciones de adaptación de las especies vegetales utilizadas en restauración de ecosistemas disturbados. El objetivo de las distintas formulaciones es utilizar bioproductos que sean de bajo costo, no tóxicos, y que tengan compatibilidad con el consorcio, además que puedan brindar una estabilidad a temperatura ambiente del prototipo con un tiempo de vida útil de más de 3 meses, con un enfoque dentro de actividades asociadas a la Investigación, el Desarrollo tecnológico y la Innovación (I+D+I), que se encuentra enmarcado en el concepto de Nivel de Madurez Tecnológica o TRL por sus siglas en inglés (Technology Readiness Level) de nivel 6 (Singh *et al.*, 2020)(Colciencias, 2016).

Teniendo en cuenta la problemática mencionada la propuesta se identifica como una innovación incremental, aunque, en el mercado existen ciertos productos usados en biotecnología agrícola que mejoran la productividad de cultivos agrícolas, la evaluación con plantas nativas de bosques con especies nativas de bosques andinos. Por lo que nos planteamos la pregunta problema. ¿Cuál es el mejor crioprotectante celular que permite mantener la viabilidad, estabilidad y pureza de un prototipo microbiano líquido a temperatura ambiente?

A partir de la problemática basándonos en el poco conocimiento sobre formulaciones de biofertilizantes nos planteamos evaluar in vitro un biofertilizante líquido de rizobacterias con crioprotectores celulares para la formulación de un prototipo con aplicación en restauración ecológica. Para esto, nos enfocamos en evaluar la viabilidad y pureza de las cepas bacterianas *Lactobacillus casei*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter sp* durante el proceso de formulación mediante técnicas microbiológicas; seleccionar los cultivos de rizobacterias a partir de un bioproceso estandarizado de fermentación líquida a 200 mL; y realizar formulaciones con matrices poliméricas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa, y crioprotectantes para la estabilidad del prototipo a escala de laboratorio.

2. MATERIALES Y METODOS

El diseño metodológico de este trabajo de grado es un modelo experimental y descriptivo; donde se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de bacterias promotoras de crecimiento de vegetal como lo son *Azotobacter spp* como fijadora de nitrógeno (Giassi et al., 2016), *Lactobacillus casei* como productor de sideróforos y solubilizadora de hierro (Agroalimentaria et al., 2016) y *Pseudomonas fluorescens* como solubilizadora de

fosfatos (Patiño-torres & Sanclemente-Reyes, 2014) cultivadas en medios de cultivos selectivos para desarrollar un prototipo de inoculante biológico partir de varias formulaciones con distintos crioprotectores y excipientes para que los microorganismos sean viables a temperatura ambiente para un posterior uso en restauración ecológica a escala vivero.

UNIVERSO Y POBLACIÓN

- **Universo:** Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal presentes en el suelo del bosque alto Andino de Colombia
- **Población:** Bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter spp*, bacterias solubilizadoras de hierro *Lactobacillus casei* y bacterias solubilizadora de fosfatos como *Pseudomonas fluorescens* aisladas de una muestra de suelo del bosque al Andino de Colombia.

"Evaluación de Rizobacterias con potencial biotecnológico usadas en proceso de restauración ecológica" del grupo de Biología celular y funcional e Ingeniería de Biomoléculas de la Universidad Antonio Nariño en convenio con la red de tecnoparque SENA - Bogotá, nodo biotecnología, dirigido por la Docente Carolina Jaime Rodríguez de la Facultad de Ciencias. Se realizó el aislamiento de tres cepas bacterianas a partir de suelo del bosque alto Andino consideradas por su producción de Ácido Indol Acético (AIA), Fijación de Nitrógeno y promoción de crecimiento en plantas nativas de bosque alto andino *Carica cundinamarquensis* J Linden , *Vallea stipularis* y *Escallonia paniculata*.

2.1. ACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN DE CEPAS

Las tres cepas microbianas se encontraban en ultracongelación a -70°C en glicerol al 50% y fueron descongeladas para realizar la siembra en cultivos líquidos (*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA*, s. f.). Los medios de cultivo utilizados fueron caldo Ashby para *Azotobacter spp*, King B y Trypticase de soya para *P.fluorescens* y caldo de Man Rogosa y Sharpe (MRS) para *Lactobacillus casei*. Se inocularon 0,2 ml del cultivo en los caldos específicos en condiciones de esterilidad bajo cabina de flujo laminar. Posteriormente, los tubos se colocaron en agitación a 150 RPM en agitador orbital MAXQ™ 4450 por 24 horas. Se determinó la viabilidad de microorganismos por presencia de turbidez en los tubos.

2.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo específicos para cada microorganismo fueron preparados según las recomendaciones de cada fabricante; el medio sólido (J.O., 1878) y líquido (Caldo, s. f.) MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), y el medio sólido King B (Medio et al., s. f.) por Laboratorios Britania S.A, el medio sólido (Sheet, s. f.) y líquido (States et al., s. f.) Trypticase de soya por Laboratorios Merck. Por otro lado el medio Ashby se preparó con la siguiente composición (g/L): manitol (20), K_2HPO_4 1, MgSO_4 (0,2), FeSO_4 (0.0005), NaCl (0,2), CaCl_2 (0,2) y agar (20) si es en sólido (Bonartseva et al., 2017; Olyunina et al., 2009).

2.3. IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CEPAS

Con las cepas bacterianas activadas se tomó una alícuota de 0,1 ml de lo que creció en los tubos y se siembra en superficie bajo la cabina de flujo laminar en medio sólido correspondiente para cada bacteria y se incubaron por 72 horas con una temperatura para Ashby de 30°C , para

MRS de 35°C y King B de 30°C, posterior a este tiempo se observó la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) identificando la viabilidad con las características macroscópicas de forma, color y tamaño, y pureza con características microscópicas por medio de tinción de Gram (Esaú López-Jácome et al., 2014). La prueba bioquímica de oxidasa se realizó con tiras Bactident® de Merck de impregnadas con el reactivo N,N-Dimetil-p-fenilendiamina.

2.4. CURVAS DE CRECIMIENTO

Se realizó una curva de crecimiento para cada cepa a partir de la siembra de los inóculos ajustados a un volumen de 200mL de cada caldo específico y se dejaron en agitación constante a 150rpm a 30°C y 35°C en un agitador orbital MAXQ™ 4450, las temperatura varía de acuerdo de cada microorganismo siendo a 30±0.2°C *Azotobacter sp* y *P.fluorescens*, y para *L.casei* a 35±0.2°C durante 48-72 horas. Se midió la biomasa con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm por duplicado y se registraron los valores obtenidos a intervalos de tiempo de 1 hora hasta alcanzar la estabilidad del crecimiento bacteriano (fase estacionaria). Se realiza los cálculos correspondientes ajustados a la curva estándar equivalente a turbidez en escala 0,5 de Mc. Farland, mediante la ecuación (1) de la recta (Portillo Cuellar & Martínez Ramirez, 2009):

$$y = 0.0662x + 0.181 \quad (1) \quad (\text{Portillo Cuellar \& Martínez Ramirez, 2009})$$

Luego de obtener la biomasa, se retiraron los caldos sembrados de incubación y se realizó de nuevo control de pureza y viabilidad. La viabilidad se determinó en este caso mediante el método de recuento en placa por medio de técnica de microgota (Strahsburger et al., 2016), realizar diluciones seriadas de cada microorganismo desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-7} tomando 1mL

de caldo líquido con inóculo y diluyendo en 9 ml de agua peptonada estéril 0,1%. Luego, se tomó una alícuota de 20 μ L de la dilución 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} y se sembró en agar sólido por triplicado de cada microorganismo en su respectivo medio de cultivo (Imagen 1), se incubaron y al pasar las 72 horas se contó las UFC.



Imagen 1: Técnica de microgota. Fuente: Beltrán P. 2020

2.5. FORMULACIONES DE PROTOTIPOS

Se realizaron 10 formulaciones (Tabla 1) utilizando dos crioprotectantes (Alginato, Glicerol) y excipientes leche descremada (LD), Carboximetilcelulosa (CMC) y Carbonato de calcio (CaCO_3), más ingrediente activo (IA) que fueron evaluados por un periodo de 5 meses (noviembre 2020 hasta abril de 2021) (Tabla 1). El volumen final del prototipo fue de 100 ml y se almacenaron a temperatura ambiente (5°C - 20°C) en un lugar fresco y seco. Los criterios de evaluación corresponden a viabilidad y pureza del consorcio de microorganismos, así como de sus características físicas (tipo de mezcla, presencia de sedimentación, viscosidad, pH,

ausencia o presencia de gas). Los porcentajes de la mezcla de Ingrediente activo más crioprotectante y/o excipientes se describen en la Tabla 2.

Tabla 1: Crioprotectantes y excipientes utilizados en las formulaciones

Formulación	CMC 0.5%	CaCO3 1 %	LD 12%	Alginato 2%	Glicerol 0.7%
1	x				
2		x	x		
3	x				
4				x	
5	x		x	x	
6	x		x		
7				x	x
8	x			x	x
9	x			x	x
10				x	x

Todas las formulaciones se evaluaron a temperatura ambiente.

Tabla 2: Porcentaje de mezclas de cada formulación

Frasco	Formulación
1	CMC 75% + IA 25%
2	CaCO3 + LD 75% + IA 25%
3	CMC 50%+ IA 50%
4	Alginato de sodio 75%+ IA 25%

5	CMC + LD+ Alginato de sodio 75% + IA 25%
6	CMC +LD 75% + IA 25%
7	Alginato de sodio + Glicerol 75%+ IA 25%
8	Alginato de sodio +Glicerol + CMC 50% + IA 50%
9	Alginato de sodio + Glicerol + CMC 30%+ IA 70%
10	Alginato de sodio + Glicerol 30%+ IA 70%

Para las formulaciones se preparó un consorcio de bacterias (IA) mezclados en partes iguales de cada cepa bacteriana como se indica en tabla 1 y tabla 2. Luego, se agregó el ingrediente activo hasta obtener un volumen de 100 mL obteniendo una mezcla homogénea.

Posterior a la formulación se evaluaron parámetros de pH con potenciómetro Mettler Toledo SevenCompact pH/Ion meter S220-Micro-Kit, viabilidad y pureza descrito en el apartado 2.4, densidad mediante el método del picnómetro Gay-Lussac como se indica en la guía (Marquez, 2013), viscosidad con viscosímetro Brookfield digital DV-I a una velocidad de 60 rpm y aguja #1, y presencia de sedimentación basado en la NTC 5842 del 2018.

2.6. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico descriptivo para evaluar las características microbiológicas. Además, se realizó un ANOVA de dos factores en programa R statistics, para evaluar las diferencias estadísticamente significativas de las variables de formulación y recuentos entre las tres formulaciones seleccionadas con un $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación la viabilidad de las cepas bacterianas durante el proceso de formulación de la evaluación del biofertilizante líquido

- **Activación y purificación de cepas**

Se realizó la activación de un banco de cepas conservadas en ultracongelación a -70°C , las PGPR fueron seleccionadas en el marco del proyecto de investigación. Se realizó la verificación de pureza de los cultivos de trabajo de *Azotobacter sp*, *L.casei* y *P.fluorescens* a partir de frascos de vidrio conservados en refrigeración a 4°C en medio líquido (Imagen. 2). Se realizó la siembra en agar sólido selectivo para cada bacteria para verificar viabilidad y pureza.



Imagen 2: Frascos de vidrio de las cepas congeladas en la universidad Antonio Nariño

La siembra en agares sólidos selectivos mediante la técnica por agotamiento por estría (Aquiahuatl & Perez, 2004) luego del periodo de incubación (Tabla 3) evidenció crecimiento característico de las bacterias inoculadas, sin embargo, se distinguieron colonias distintas a las reportadas en literatura por lo que se realizó tinción de Gram para confirmar o descartar la contaminación.

Tabla 3: Condiciones óptimas para crecimiento de las cepas bacterianas

Microorganismo	Agar o caldo	Temperatura óptima	Vel. Agitación (RPM)	Tiempo de incubación
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS	35°C	150 rpm	48 a 72 hrs
<i>Azotobacter sp</i>	Ashby	30°C	150 rpm	48 a 72 hrs
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	King B	30°C	150 rpm	48 a 72 hrs

Todos los microorganismos se incuban en atmosfera de aerobiosis

Posteriormente, se realizó la purificación de las cepas y verificación macroscópica de crecimiento microbiano de acuerdo con las características de tamaño, forma, superficie, borde, elevación y color de las colonias.

Se evidenció crecimiento característico en agar King B, las colonias correspondientes a este género de bacterias *Pseudomonas spp* evidenciaron una coloración crema-blanco, sin producción de pigmentación, opacas y con forma circular coincidiendo con las características macroscópicas como se indica en (Rodríguez, 2009), luego de purificadas se procedió a los ensayos experimentales de producción de biomasa en medio líquido y diseño de un método de conservación. Durante la siembra en medio de cultivo sólido ASHBY se evidenció crecimiento y se observaron las colonias y según la literatura son lisas, opacas, poco convexas, viscosas y transparentes en forma de gotas de agua (Flores.C & Rodrigez.R, 2014), se infiere que tiene las características propias de este género *Azotobacter spp*.

En medio de cultivo MRS se observó el crecimiento característico a partir de la cepa madre conservada en ultracongelación, se adicionó 100µL de la bacteria en 9 mL de medio de cultivo y se incubó en condiciones óptimas de crecimiento (Imagen 3). Se observó crecimiento por la presencia de turbidez en el medio de cultivo (Imagen 4) la turbidez es debida al desarrollo

bacteriano como lo es la producción de biomasa (Somebody, 2011), es decir, se activaron los microorganismos y posteriormente se llevaron a siembra para crecimiento en agar sólido.



Imagen 3: Tubo 1: sin inocular.



Imagen 4: Activación en caldo MRS t:72h con *L.casei* de la muestra 2

Se procedió a realizar un análisis microscópico de las bacterias que crecieron en agar sólido para confirmar la pureza de acuerdo a la morfología bacteriana de cada especie con prueba de tinción de Gram e identificación bioquímica (prueba de catalasa y oxidasa) a las muestras y así determinar si están puras o realizar procedimiento de pureza.

En la tabla 4, se muestran los resultados obtenidos durante la evaluación de viabilidad, pureza y pruebas bioquímicas oxidasa y catalasa. Los resultados para catalasa son negativos para *Lactobacillus casei*, sin producción de burbujas coincidiendo este resultado en (Shukla et al., 2008) y la prueba de Gram de *Lactobacillus* corresponden a bacilos gram positivos alargados según (Martins et al., 2009) y se confirman las características microscópicas propias de este género siendo una cepa pura de acuerdo a los resultados obtenidos.

Para *Azotobacter sp* se analizaron cuatro muestras (Tabla 4) a las cuales se les realizó prueba de catalasa y los resultados fueron positivo, y en la prueba de oxidasa los resultados dieron negativo. Hala y Ali realizaron caracterización de *Azotobacter* y la prueba de catalasa para especies *Azotobacter paspali* y *Azotobacter vinelandii* dieron positivo, y hay *Azotobacter paspali* (oxidasa negativo), y *Azotobacter vinelandii* (oxidasa positivo) (Hala & Ali, 2019). Se tiene una identificación presuntiva de estas dos especies de *Azotobacter*, que se tendría que confirmar con identificación molecular, se realiza el acercamiento a la taxonomía por pruebas bioquímicas. En la prueba de gram todas mostraron morfología asociada a bacilos gram negativo confirmando estas características microscópicas en la literatura (Khosravi & Dolatabad, 2020). En la evaluación microbiológica para las bacterias *P. fluorescens* se analizaron seis muestras (Tabla 4) se verificó su metabolismo por crecimiento característico en agar King B, confirmando con prueba de catalasa, en todas las colonias dieron positivo para catalasa. Los resultados para la prueba de gram corresponden a bacilos gram negativos y se confirman las características microscópicas y pruebas bioquímicas en la literatura (Moore, 2004), sin embargo, en tres muestras (3.1, 3.2 y 4) se evidenció contaminación por lo que se descartaron como cepas de trabajo. Se decide conservar la muestra #1 para seguir con la parte experimental ya que inferimos que es una cepa pura de acuerdo a los resultados de las pruebas.

Tabla 4: Resultados de prueba de tinción de Gram y pruebas bioquímicas

Muestra	Catalasa	Oxidasa	Gram	Descripción de Gram
L. casei #1	-	N/A	+	Bacilos alargados con extremos

				redondeados
Azotobacter #1	+	-	-	Bacillos corto
Azotobacter #2	+	+	-	Bacilos ovalados con formación de quistes (puro)
Azotobacter #3	+	+	-	Bacilos alargados (puro)
Azotobacter #4	+	-	-	Bacilos alargados
P.fluorescens #1	+	+	-	Bacilos alargados empalizados (puro)
P.fluorescens #2	+	NR	-	Cocobacilos, otras morfologías no características
P.fluorescens #3.1	+	NR	-	Bacilos, otras morfologías no características
P.fluorescens #3.2	+	NR	+	Bacilos, otras morfologías no características
P.fluorescens #4	+	NR	+	Bacillos, otras morfologías no características
P.fluorescens #5	+	+	-	Bacillos cortos (puro)

NR: no realizado por evidenciar cultivos mixtos

Con las características macroscópicas y microscópicas ya identificadas se realizó repique de colonias a un cultivo fresco. Se escogieron las colonias con características puras y se sembraron de nuevo en agares sólidos para obtener estas en un medio de solo bacterias purificadas con posterior prueba de Gram, se evidenció crecimiento uniforme de las colonias correspondientes a cada cepa bacteriana y morfología microscópica correspondiente para

L.casei (Imagen 5, Imagen 8), *P.fluorescens* (Imagen 6, Imagen 9) y *Azotobacter* sp (Imagen 7, Imagen 10).



Imagen 5: Crecimiento de *L.casei* purificadas en medio de cultivo MRS



Imagen 6: Crecimiento de *P.fluorescens* purificadas en medio de cultivo King B

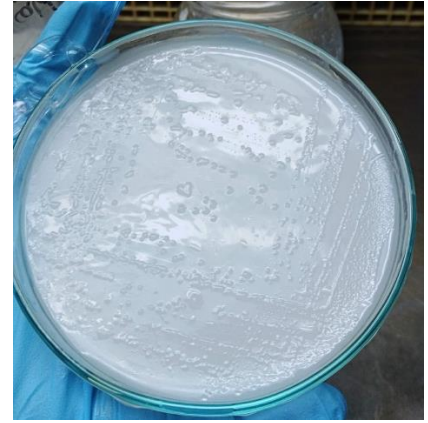


Imagen 7: Crecimiento de *Azotobacter* sp purificadas en medio de cultivo ASHBY

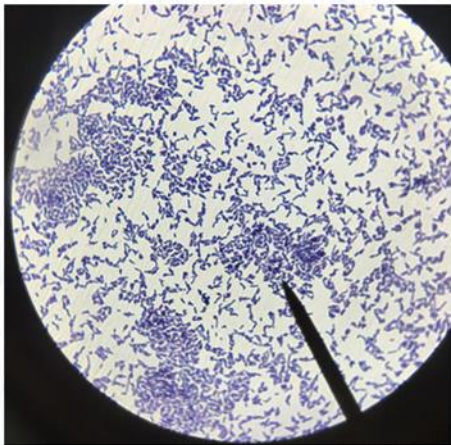


Imagen 8: tinción de gram de *L.Casei* purificada 100X

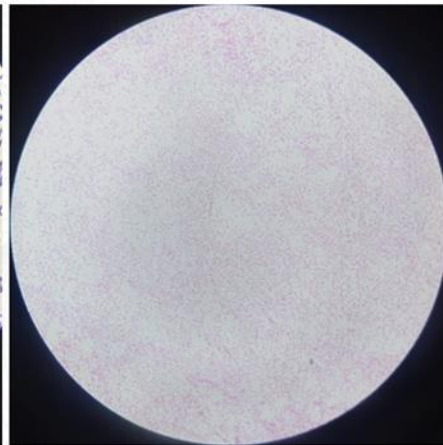


Imagen 9: tinción de gram de *P.Fluorescens* purificada 100X

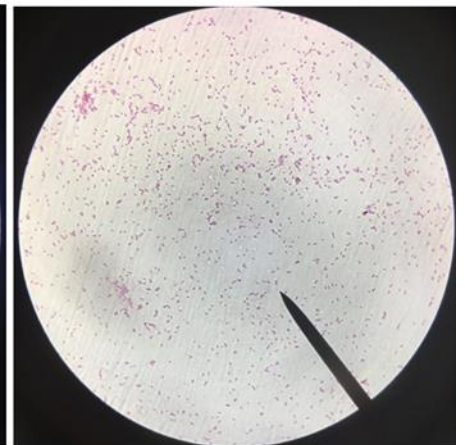


Imagen 10: tinción de gram de *Azotobacter* sp purificada 100X

3.2. Selección de los cultivos de rizobacterias a partir de un bioproceso estandarizado de fermentación líquida a 200 mL

Teniendo las cepas purificadas se procedió a inocularlas en caldo líquido a un volumen de 200 mL (Imagen 11, Imagen 12) para producción de biomasa, se llevaron a incubación en Shaker maxQ 4450 en condiciones óptimas de crecimiento como se referencia en la tabla 1.



Imagen 11: Caldo líquido de ASHBY y MRS a la hora 0 con bacterias correspondientes puras

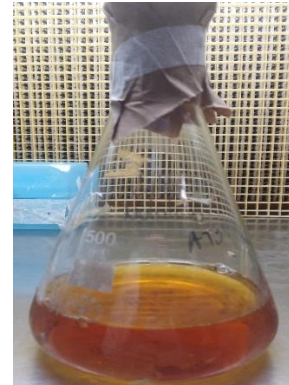


Imagen 12: Caldo líquido King B a la hora 0 con inóculo puro

Desde la hora 0 en la inoculación en caldos líquidos se procedió a realizar curva de crecimiento, las variables de crecimiento fueron estandarizadas según (Trabajo de grado. Calderón Stephany, Lopez Veronica, Peña Yineth. 2019).

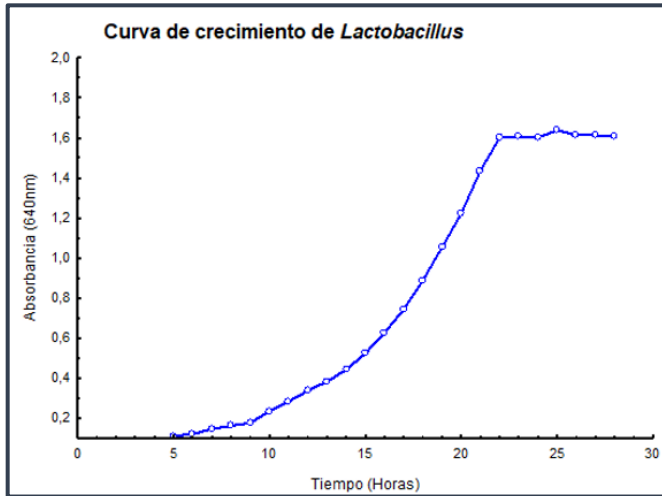
La curva estándar del patrón de Mc.Farland se obtuvo de (Portillo Cuellar & Martinez Ramirez, 2009) y a partir de la Ecuación para la absorbancia (2), se halló la x , la x es el cálculo numérico de las UFC/ml a partir de la absorbancia obtenida.

Absorbancia: $y = 0.0662x + 0.181$; (2)

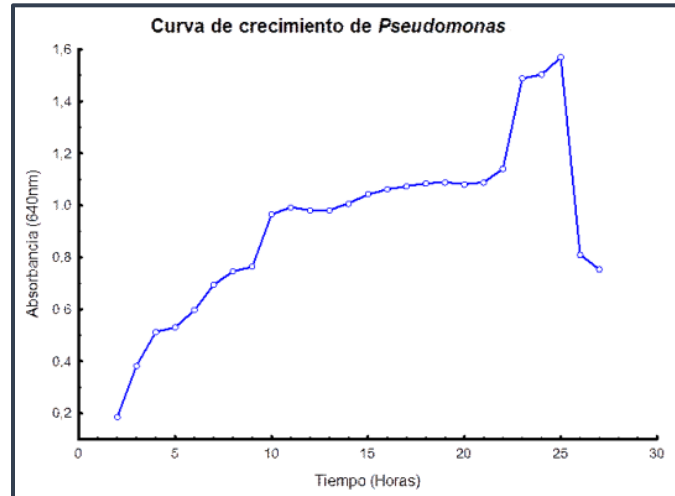
Despejamos X para hallar UFC/ml, como se presenta en la Ecuación (3)

$$X = \frac{Y-0.181}{0.0662} \quad (3)$$

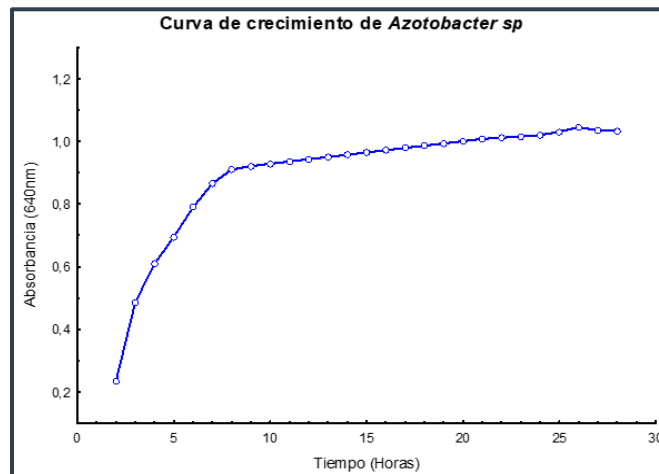
A continuación, se muestran las curvas de crecimiento para cada microorganismo en medio líquido.



Gráfica 1: Curva de crecimiento de la cepa de *Lactobacillus casei*



Gráfica 2: Curva de crecimiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens*



Gráfica 3: Curva de crecimiento de la cepa de *Azotobacter.sp*

Tabla 5: Densidad óptica a una longitud de onda de 640nm de biomasa final en el punto máximo de la fase estacionaria de las bacterias

Microorganismo	Absorbancia a 640nm	UFC/mL
<i>L.casei</i>	1,4952	1,98 x 10 ⁸
<i>Azotobacter</i>	0,292	1,6 x 10 ⁷
<i>P.fluorescens</i>	0,986	1.2 x 10 ⁶

En la curva de crecimiento para *L.casei* (Gráfica 1) se evidencia que la fase logarítmica, va hasta 22 hrs con una absorbancia de 1,49, y desde 22 - 27 hora se evidencia la fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento se mantiene estable en función del tiempo y se encuentra en su máximo punto de producción de biomasa con un valor de 1,98 x 10⁸ UFC/mL, luego decrece donde es en la fase muerte como consecuencia del agotamiento de nutrientes.

La curva de crecimiento para *Azotobacter* (Gráfica 3) se evidencia que la fase logarítmica, va hasta la hora 7 con una absorbancia de 0,292, y desde 8 – 28 horas se evidencia la fase estacionaria y se encuentra en su máximo punto de producción de biomasa con un valor de 1,6x 10⁷UFC/mL.

En la curva de crecimiento para *P.fluorescens* (Gráfica 2) se evidencia la fase logarítmica, va hasta la hora 10 con una absorbancia de 0,986, y desde 11- 22 horas se evidencia la fase estacionaria con un valor de producción de biomasa en su punto máximo de 1.2 x 10⁷ UFC/mL y desde 23 - 25 hrs hay un pico que lo definimos como crecimiento diauxico (Kremling et al., 2018) que tiene lugar cuando hay presencia de dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados nutriente (Sun et al., 2020), y como finalidad se tiene fase de muerte.

La gráfica 1, 2 y 3 corresponden a las curvas de crecimiento de las tres cepas bacterianas ajustando las variables de crecimiento como se indica en la tabla 1 a volumen de 200 mL

3.3. Realización de distintas formulaciones con crioprotectantes y excipientes para un biofertilizante líquido de rizobacterias a escala de 100 ml.

Se realizaron 10 formulaciones distintas con diferentes crioprotectantes celulares y excipientes a diferentes concentraciones en condiciones de esterilidad. Se usó Carboximetilcelulosa (CMC) grado USP, Carbonato de calcio (CaCO₃) grado reactivo, Leche descremada (LD) grado alimenticio, alginato de sodio en polvo grado alimenticio y glicerol líquido grado USP.

Tabla 6: Parámetros de evaluación de los inoculantes biológicos

FORMULA CION	TIPO DE MEZCLA	SEDIMENTA CION	VISCOSIDAD (cP)	DENSIDAD	pH	GAS	Recuento (UFC)								
							Agar Ashby*			Agar MRS*			Agar King B*		
							-5	-6	-7	-5	-6	-7	-5	-6	-7
1	HM	Blanda	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	HT	N/A	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	HT	Blanda	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	HM	N/A	5.7	1,030503713	5.11	No	63	43	9	10	1	0	5	1	0
5	HM	Blanda	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	HM	Blanda	-	-	-	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	HT	Blanda	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	HT	Blanda	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	HM	N/A	3.6	1,013425647	4.67	No	47	62	6	124	20	2	0	0	0
10	HM	N/A	3.1	1,043857623	4.83	No	100	76	5	157	87	10	9	5	0

HT: Heterogéneo, HM: Homogéneo. Solo se realizan ensayos fisicoquímicos y microbiológicos a 3 formulaciones.

- Diluciones 10⁵, 10⁶, 10⁷

Se realizó la evaluación de estabilidad de parámetros basados en la norma ICONTEC NTC 5842:2018 Bioinsumos para uso agrícola, inoculantes biológicos. Requisitos y NTC 4686: 1999 fertilizantes líquidos, examen visual preliminar y preparación de muestras para ensayos físicos;

de acuerdo a los requisitos de un producto líquido con uso de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas y solubilizadoras de fosfato.

Las seis primeras formulaciones se realizaron en noviembre del 2020 y se dejaron a temperatura ambiente, posteriormente en la última semana de enero del 2021 se observó los recipientes y se determinó que las formulaciones 1, 2, 3, 5, y 6 tienen parámetros no aceptables con formación de sedimentación, mezcla heterogénea, y producción de gas, por lo que se decide descartarlas. Hasta el momento la formulación 4 conservó con parámetros organolépticos y físicos deseados, y se procedió a verificar la estabilidad con técnica de recuento a los tres meses con toma de pH para confirmar su actividad metabólica, solamente se realizó un recuento microbiológico por duplicado por restricción de movilidad por pandemia de Covid-19.

Se procede a realizar unas nuevas formulaciones en febrero del 2021 usando glicerol estéril para dar una mayor estabilidad al bioproducto, y al mes de su fabricación se realizó un solo recuento de las formulaciones 9 y 10 con especificaciones de inoculante biológico dentro de la normatividad vigente NTC 5842 con concentración mínima de UFC/g o UFC/ml 1×10^4 y pureza de microbiológica mínima del 95%. Las formulaciones 6 y 7 se descartaron características físicas no aceptables de un inoculante.

Finalmente se seleccionaron tres formulaciones que está en el orden de 1×10^7 (*Azotobacter*), 1×10^6 (*L.casei*) y 1×10^6 (*P.fluorecens*), dando cumplimiento a la normativa colombiana de recuento mayor a 1×10^4 , pH según nuestras especificaciones de acuerdo a las NTC 5842 y sin producción de gas, por lo que se les da el crédito a los dos crioprotectantes más eficientes que son el Alginato de sodio y el glicerol, los cuales les brinda una alta estabilidad al bioproducto

en condiciones ambientales con pureza del 95%. El alginato de sodio y el glicerol son compuestos no tóxicos con propiedades adhesivas y limita la transferencia de calor; y estas propiedades son útiles para apoyar la supervivencia a largo plazo del inoculante (Qian et al., 2011); estos dos polímeros llevan a cabo un proceso llamado coacervación simple o compleja, dependiendo de si contiene los dos o un polímero a la vez; este proceso se basa en la formación de un líquido rico en fase polimérica en equilibrio con otra fase líquida llamada coacervado y se demuestra que es obtener bacterias que contienen polímero mediante coacervación compleja (Schoebitz et al., 2013), que se asocia a la formación de gotículas de coacervado, un tipo de microencapsulación en medio líquido. La adición de glicerol a las formulaciones preserva la viabilidad de las células como se confirma en un estudio usando *Pseudomonas fluorescens* (Bashan et al., 2014); y usando alginato proporciona propiedades mecánicas como rigidez, la elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua, y formación de sales en distintas concentraciones se forman diferentes grados de viscosidad (Gonzales Infante, 2015).

Se realizó un análisis estadístico ANOVA con análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. En el análisis de recuento bacteriano del prototipo vs Bacteria *Azotobacter*, el valor de F (2161,625) es mayor que el valor crítico para F (4,256), lo que indica que si hay diferencias significativas porque el $P < 0,05$; el análisis de prototipo vs Bacteria *L.casei* de F (35424,2) es mayor que el valor crítico para F (4,256), lo que indica que si hay diferencias significativas porque el $P < 0,05$; y para el análisis de prototipo vs Bacteria *P.fluorescens* de F (170,33) es mayor que el valor crítico para F (4,256), lo que indica que si hay diferencias significativas porque el $P < 0,05$.

El promedio de los resultados de pH final medido en las tres formulaciones son los siguientes: prototipo 4 (5,11), prototipo 9 (4,67) y prototipo 10 (4,83). El promedio viscosidad final medida en las tres formulaciones fue: prototipo 4 (5,7), prototipo 9 (3,6) y prototipo 10 (3,1). El promedio de los resultados de densidad final medida en las tres formulaciones es: prototipo 4 (1,0305), prototipo 9 (1,01342) y prototipo 10 (1,0438).

CONCLUSIONES

El alginato de sodio y el glicerol fueron los que presentaron una compatibilidad sobre la viabilidad del consorcio de rizobacterias sin efecto sobre las capacidades fisiológicas de las bacterias a temperatura ambiente. De las diez formulaciones solo se escogieron tres de acuerdo con las características físicas del producto, aunque dos con los dos mejores crioprotectantes celulares con criterio de uniformidad del producto sin formación de precipitado, de forma líquida ligeramente viscosa y sin producción de gas.

Se logró realizar un banco de cepas para mantener la viabilidad y pureza de las cepas de trabajo en glicerol al 50% y la estandarización de la producción de biomasa para cada una de las cepas a escala pequeña de 100 ml.

De igual manera es de preferencia mantener la estabilidad del bioproducto líquido por al menos tres meses a temperatura ambiente con una cantidad mínima de unidades formadoras de colonias de 1×10^4 para cada microorganismo, con una pureza mínima microbiológica del 95%, con pH y viscosidad especificada por el productor según la norma ICONTEC NTC 5842 del 2018; y con un examen de características físicas según la NTC 4686 de 1996 para fertilizantes líquidos.

Se evidencio según la estadística que si hay diferencias significativas de recuento de cada cepa bacteriana en cada formulación con cada medio de cultivo selectivo $p < 0,05$.

RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer un rediseño de metodología de conservación para el género de *P.fluorescens* ya que evidenció contaminación en varias etapas del proceso y se requiere realizar purificación constante, recomendaría optar por método de liofilización; también es recomendable usar glicerol o glicerina vegetal a partir de aceites de soja, coco o palma, ya que son aditivos orgánicos esenciales y compatibles con bioproductos de uso agrícola y forestal.

Por otro lado, se recomienda continuar el control de requisitos microbiológicos y fisicoquímicos para un inoculante biológico ya que requiere como finalidad obtener una estabilidad del producto de 6 meses a 1 año a temperatura ambiente para luego realizar ensayos de eficacia a escala de vivero con plantas nativas del bosque altoandino de Colombia para la evaluación de promoción de crecimiento, supervivencia y actividad simbiótica de las plantas.

Es importante mantener condiciones de esterilidad durante el proceso de formulación y de las sustancias a utilizar, se recomienda realizar una preparación volumétrica de los crioprotectantes y excipientes para mejorar la solubilización de producto obteniendo una mezcla homogénea. De igual manera usar leche descremada líquida realizando control de pH ajustado a 7 ± 0.2 para evitar acidificación del medio y posterior liofilización del bioproducto.

Es de importancia conocer las diferencias significativas de cada formulación respecto a las variables microbiológicas y variables físicas, por lo que es recomendable seguir haciendo

seguimiento de estos parámetros posterior de 6 meses a 1 año de su preparación para conocer con certeza estas diferencias significativas.

La caracterización molecular de las bacterias no se alcanzó a realizar, aunque ya están en proceso de activación, sin embargo, por restricciones de movilidad internacional de cepas no se logró realizar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermanos por apoyarme todo el tiempo y estar ahí en los momentos difíciles, siempre con amor y confianza en mí, y en los proyectos que me propongo, de igual manera gracias a mi profesora, mentora y directora de tesis Carolina Jaime por estar presente en cada etapa de este proyecto, ser mi guía y por brindarme sus conocimientos, ayudarme y apoyarme en mi capacidades siendo un ejemplo a seguir. A la Universidad Antonio Nariño sede Bogotá y la red de Tecnoparque SENA de Bogotá nodo biotecnología y nanotecnología por la financiación del trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- Acero Nitola, A. M., & Cortés Pérez, F. (2014). Propagación de especies nativas con potencial para restauración ecológica en la microcuenca río La Vega, Tunja-Boyacá. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(147), 195. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.76>
- Agroalimentaria, B., Gabriela, D. R. A., & Ramos, M. (2016). *Universidad Politécnica de Guanajuato*.

- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, Y. K. E. (2014a). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338-347. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, Y. K. E. (2014b). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338-347. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Aquihuatl, M. de los A., & Perez, M. de L. (2004). Manual de practicas del laboratorio general de Microbiología. En *Manual de prácticas laboratorio*.
- Barajas, N. (2017). Biofertilizantes : conceptos , beneficios y su aplicación en Colombia. *Ingeciencia*, 2(March), 65-76.
- Barrero Cuevas, L. (2009). M clínica icrobiología. *Universidad Europea de Madrid*, 13-14. <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). En *Plant and Soil* (Vol. 378, Números 1-2, pp. 1-33). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Biradar, B. J. P. (2018). Role of Polymeric Additives in Formulation, Shelf-life and Bioefficacy of Liquid Inoculant of *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 6(4), 123-133. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.6822>

Bokkestijn, A. (2017). *Libro_Bosques_Andinos_Interactivo.pdf*.

Bonartseva, G. A., Akulina, E. A., Myshkina, V. L., Voinova, V. V., Makhina, T. K., & Bonartsev, A. P. (2017). Alginate biosynthesis by Azotobacter bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1), 52-59. <https://doi.org/10.1134/S0003683817010070>

Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Número 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

Calderón Stephany, Lopez Veronica, Peña Yineth. 2019. Tesis : Evaluación del antagonismo entre distintas cepas de rizobacterias aisladas de suelo en proceso de restauración ecológica en la localidad de Usme. Trabajo de Grado para optar al título de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá D.C. Directora de Trabajo de Grado: Carolina Jaime Rodríguez.

Caldo, M. R. S. (s. f.). *M.R.S. Caldo*. 1-2.

Colciencias. (2016). Niveles de madurez tecnológica. *Colombia Científica, Anexo 13*, 5. <https://www.colciencias.gov.co/sites/default/files/upload/convocatoria/anexo-13-niveles-madurez-tecnologica-conv.pdf>

de Blécourt, M., Gröngroft, A., Baumann, S., & Eschenbach, A. (2019). Losses in soil organic

carbon stocks and soil fertility due to deforestation for low-input agriculture in semi-arid southern Africa. *Journal of Arid Environments*, 165, 88-96.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.02.006>

De, D. D. E. L. P., & Oleagionosa, A. P. D. E. U. N. A. (2018). *BIODIESEL - GLICERINA*.

Diana Milena Pérez y Jency Daniela Catama. 2018. Tesis : Evaluación de rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de Bosque Alto Andino para uso en restauración ecológica del corredor Chingaza-Sumapaz. Mención: Meritoria . Trabajo de Grado para optar al título de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá D.C. Directora de Trabajo de Grado: Carolina Jaime Rodríguez.

Dolly Geraldine Romero, Paola Andrea Romero silva. 2017 . Evaluación de la actividad enzimática pectinolítica, amilolítica y lipolítica de las rizobacterias usadas en restauración ecológica del bosque alto andino. Trabajo de Grado para optar al título de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá D.C. Directora de Trabajo de Grado: Carolina Jaime Rodríguez.

Esaú López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. 3. www.medigraphic.org.mx

Flores.C & Rodriguez.R. (2014). Azotobacter: una bacteria con potencial como biofertilizante eco-amigable. *Abril 2014, April 2014, 1.*
https://www.researchgate.net/publication/274638111_Azotobacter_una_bacteria_con_potencial_como_biofertilizante_eco-amigable

Gabriela Gómez Avendaño, Johana Cristina Hernández y Diego Fernando González. 2018. Tesis: Evaluación de la capacidad fijadora de Nitrógeno de rizobacterias nativas de bosque alto andino. Mención: Meritoria. Trabajo de Grado para optar al título de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá D.C. Directora de Trabajo de Grado: Carolina Jaime Rodríguez.

Giassi, V., Kiritani, C., & Kupper, K. C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, 190, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>

Gonzales Infante, E. J. (2015). *FORMULACIÓN DE UN INOCULANTE BACTERIANO DE Azospirillum brasilense Cd PARA LA REVEGETACIÓN DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS*. https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46544603/Formulacion_de_un_inoculante_bacteriano_para_la_revegetacion_de_zonas_aridas.pdf.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1526684093&Signature=08yWwv2HDN5jt5mHE4tPfb9Zbpw%3D&response-content-

Hala, Y., & Ali, A. (2019). Isolation and Characterization of Azotobacter from Neems Rhizosphere. *Journal of Physics: Conference Series*, 1244(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1244/1/012019>

J.O. (1878). Mrs. Agar. *Notes and Queries*, s5-X(251), 308. <https://doi.org/10.1093/nq/s5-X.251.308-c>

Juan Pablo Crespo Antia. 2017. Evaluación del crecimiento de *Bacharis* spp. en dos tipos de

suelo inducido por un consorcio de microorganismos comerciales en invernadero para su uso en restauración ecológica”. Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Ambiental. Universidad el Bosque. Bogotá D.C. Directora de Trabajo de Grado: Carolina Jaime Rodríguez.

Jiang, Q., Zhou, P., Liao, C., Liu, Y., & Liu, F. (2020). Spatial pattern of soil erodibility factor (K) as affected by ecological restoration in a typical degraded watershed of central China. *Science of the Total Environment*, 749, 141609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141609>

Karthikeyan, A., & Sakthivel, K. M. (2011). Efficacy of Azotobacter Chroococcum in rooting and growth of Eucalyptus camaldulensis stem cuttings. *Research Journal of Microbiology*, 6(7), 618-624. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.618.624>

Khosravi, H., & Dolatabad, H. K. (2020). Identification and molecular characterization of Azotobacter chroococcum and Azotobacter salinestris using ARDRA, REP, ERIC, and BOX. *Molecular Biology Reports*, 47(1), 307-316. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05133-7>

Kremling, A., Geiselman, J., Ropers, D., & de Jong, H. (2018). An ensemble of mathematical models showing diauxic growth behaviour. *BMC Systems Biology*, 12(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12918-018-0604-8>

Lafuente Aranda, G. (2017). “ Glicerol : Síntesis Y Aplicaciones ”. *Universidad Nacional De Educación a Distancia Má*, 18. http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Glafuente/Lafuente_Aranda_Gustavo_TFM.pdf.

- Leal, L. C. S., & Ramírez, L. C. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, 3(4), 21-29. <https://doi.org/ISSN: 1794-2470>
- Marquez, K. (2013). *Determinación De Densidad : Método Del Picnómetro*. 7-10.
- Martha Alfonso González, D. J., González Sosa, N., & Nancy López Banasco, T. (2015). Viabilidad y características culturales, tintoriales, morfológicas y bioquímicas de una colección bacteriana Assessing feasibility and cultural characteristics, staining, morphological and biochemical bacterial collection. En *Revista Cubana de Medicina Militar* (Vol. 44, Número 1). <http://scielo.sld.cu>
- Martins, F. S., Silva, A. A., Vieira, A. T., Barbosa, F. H. F., Arantes, R. M. E., Teixeira, M. M., & Nicoli, J. R. (2009). Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. *Archives of microbiology*, 191(8), 623-630. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0491-x>
- Medio, U. S. O., Agar, F., En, F., Gramos, E. N., Litro, P. O. R., Del, S., Medio, P., Medio, A., Siembra, P., Examinar, D. E. L. O. S. R., & Suspende, I. (s. f.). *Pseudomonas Agar F*.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2015). Plan Nacional de Restauración. Restauración ecológica, rehabilitación y recuperación de áreas disturbadas. En *Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible*.
- Moore, E. R. B. (2004). Pseudomonas. *Pseudomonas, January*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9086-0>
- Murcia & Guariguata. (2014). La restauración ecológica en Colombia. En *Documentos Ocasionales 107*. http://www.cifor.org/publications/pdf_files/occpapers/OP-107.pdf

- Olyunina, L. N., Matskova, Y. A., Goncharova, T. A., & Gushina, Y. Y. (2009). Evaluation of thermal resistance of *Azotobacter chroococcum* 66 using atomic force microscopy. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(1), 38-42.
<https://doi.org/10.1134/S0003683809010074>
- Patiño-torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). MSF una alternativa biotecnol. *Entramado*, 10(2), 288-297.
- Pérez Castillo, A. I., Betancourt Bravo, A. I., Duque Ortiz, A. I., & Lobo Rivero, E. I. (2016). Criopreservación y almacenamiento de *Mycoplasma* spp. *Rev. Salud Anim*, 38(2), 105-111.
- Portillo Cuellar, J. E., & Martínez Ramírez, A. L. (2009). *Obtención de amilasa por cinética de crecimiento con el microorganismo bacillus subtilis ATCC 6633 utilizando como medio de cultivo cascara de papa*. 1-116.
- Qian, P., Schoenau, J., & Urton, R. (2011). Effect of soil amendment with thin stillage and glycerol on plant growth and soil properties. *Journal of Plant Nutrition*, 34(14), 2206-2221.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2011.618579>
- Rodríguez, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. *Tesis*, 197.
- Santhosh, G. P. (2015). Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. *International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology*, 2(7), 243-247. www.vmsindia.org
- Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for

better soil-plant fertilization. A review. En *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 33, Número 4, pp. 751-765). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>

Sheet, T. D. (s. f.). *GranuCult™ Tryptic Soy Agar*. 7-9.

Shukla, G., Devi, P., & Sehgal, R. (2008). Effect of *Lactobacillus casei* as a probiotic on modulation of giardiasis. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(10), 2671-2679. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-0197-3>

Singh, H., Bhat, J. A., Singh, V. P., Corpas, F. J., & Yadav, S. R. (2020). Auxin metabolic network regulates the plant response to metalloids stress. *Journal of Hazardous Materials*, July, 124250. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124250>

Somebody. (2011). Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antárticos: descripción de cuatro nuevas especies. *Metodología*, 4, 51-123.

States, U., Composition, T., & Origin, P. N. (s. f.). *Technical Data Sheet Tryptic Soy Broth (TSB) non-animal origin, irradiated*. 2-4.

Strahsburger, E., Retamales, P., Estrada, J., & Seeger, M. (2016). Microdot chromogenic method for sanitary monitoring 1 Microdot method: used with chromogenic agar is a useful procedure for sanitary monitoring in aquaculture. *Lat. Am. J. Aquat. Res*, 44(4), 742-749. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-9>

Sun, H., Zhang, X., Wang, D., & Lin, Z. (2020). Insights into the role of energy source in hormesis through diauxic growth of bacteria in mixed cultivation systems. *Chemosphere*, 261, 127669. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127669>

*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA. (s. f.).*
