



Caracterización de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal en la Granja UNIMINUTO-
Villavicencio Meta

Joseph Daza Nuvar, Felipe Andrés Marca Torres y Nelson Andrés Alfonso Zorro

Corporación Universitaria Minuto de Dios

Rectoría Regional Orinoquía

Sede Villavicencio (Meta)

Programa Ingeniería Agroecológica

Abril de 2022

Caracterización de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal en la Granja UNIMINUTO-
Villavicencio Meta

Joseph Daza Nuvan, Felipe Andrés Marca Torres y Nelson Andrés Alfonso Zorro

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero en Agroecología

Asesor(a)

Martha Lucia Velasco Belalcázar
Bióloga MSC Ciencias Agrarias Fitopatología

Co- asesor (a)

Carlos Alberto Hernández Medina
Biólogo MSC Ciencias Agrarias Fitopatología

Corporación Universitaria Minuto de Dios

Rectoría Regional Orinoquía

Sede Villavicencio (Meta)

Programa Ingeniería Agroecológica

Abril de 2022

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a Juan Camilo Solano Marín, quien en algún momento de la vida nos acompañó en este trabajo de grado y que a su vez, dicho trabajo lo llenó de mucha fortaleza para continuar adelante en su lucha contra el cáncer, quien perdió la batalla contra esta enfermedad, pero ganó un lugar en nuestros corazones y aun así habiendo podido ser un excelente ingeniero en agroecología tenía un papel más importante por cumplir en la eternidad, “en dedicatoria a Juan Camilo Solano Marín, siempre en la mente y en el corazón”, “familia y fortaleza”.

Agradecimientos

Un inmenso agradecimiento a la profesora Martha Lucia Velasco Belalcázar y Carlos Hernández Medina, quienes nos permitieron ser parte de esta investigación ya que muy disciplinadamente nos han aportado todos sus conocimientos, tutoría y constancia durante el tiempo que se ha trabajado en este proyecto, a Dios y a la Vida por permitirnos conocer estas dos personas tan maravillosas y dedicadas en este proyecto, a nuestras familiares, amigos y personas que llegaron a apoyarnos moralmente y de alguno u otra manera a seguir adelante con este proyecto y continuar adelante con nuestros estudios.

Contenido

Lista de tablas	7
Lista de figuras	8
Lista de anexos	10
Resumen	11
Abstract	12
Introducción	13
CAPÍTULO I	17
1 Objetivos	17
1.1 Objetivo general	17
1.2 Objetivos específicos	17
CAPÍTULO II	18
2 Planteamiento del problema	18
2.1 Definición del problema	18
2.2 Pregunta de investigación	19
CAPÍTULO III	20
3 Justificación	20
CAPÍTULO IV	22
4 Marco teórico	22
4.1 Marco conceptual	22
4.2 Marco legal	32
CAPÍTULO V	36
5 Metodología y diseño experimental	36
5.1 Ubicación geográfica del área de estudio	36
5.2 Metodología	37
CAPÍTULO VI	42
6 Resultados y discusión	42
6.1 Resultados	42

	6
CAPÍTULO VII	50
7 Conclusión	50
CAPÍTULO IX	51
8 Referencias	51
CAPÍTULO IX	59
9 Anexos	59

Lista de tablas

Tabla 1. Relación de aislamientos bacterianos rizosférico de acuerdo con la especie vegetal y evento de muestreo, página 42.

Tabla 2. Resultados de las principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación a nivel de género de los aislamientos antagónicos encontrados en la granja agroecológica-UNIMINUTO, página 45.

Lista de figuras

Figura 1. Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*. Producción de A) lipopéptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) δ -endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica. Tomada de: (Villareal, et al. 2018), página 28.

Figura 2. Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) Mecanismo de acción de los lipopéptidos. Tomada de: (Villareal, et al. 2018), página 29.

Figura 3. Los sideróforos como mecanismo de inhibición a fitopatógenos. A) Captura y solubilización de hierro, B) principales estructuras quelantes de los sideróforos. Tomada de: (Villareal, et al. 2018), página 30.

Figura 4. Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos por enzimas líticas. Tomada de: (Villareal, et al. 2018), página 31.

Figura 5. Ubicación geográfica del área de estudio, granja agroecológica UNIMINUTO Villavicencio Meta – Colombia, página 36.

Figura 6. Selección y pesaje de suelo rizosférico para realizar el aislamiento de colonias bacterianas, página 38.

Figura 7. Aislamiento de bacterias rizosféricas: A) Diluciones seriadas; B) Toma de 40 μ L de la dilución para siembra y C) Siembra en cajas con Agar Nutritivo, página 38.

Figura 8. Cultivo puro de bacteria rizosférica (*Bacillus sp.*) obtenida de una planta de Yarumo en el sector del bosque secundario, página 39.

Figura 9. Prueba de antagonismo mediante la técnica de enfrentamiento dual, página 41.

Figura 10. Enfrentamiento dual del aislamiento bacteriano B1-6 frente a *Fusarium oxysporum*, con antagonismo de categoría positiva, página 43.

Figura 11. Enfrentamiento dual del aislamiento bacteriano B1-5 frente a *Fusarium oxysporum*, con antagonismo de categoría positivo, página 44.

Lista de anexos

Anexo A. Fluorescencia de la bacteria A1-6, en medio King B, perteneciente a *Pseudomonas* sp de la granja UNIMINUTO observadas en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario, pagina 59.

Anexo B. Enfrentamiento dual bacterias # frente al hongo patógeno *Fusarium oxisporum*, pagina 59.

Anexo C. Siembra por agotamiento de la bacteria A1-1 (Sector café, bacteria 1, primer muestreo), pagina 60.

Anexo D. Siembra por estría de la bacteria B2-1 (Sector bosque, bacteria 2, primer muestreo), pagina 60.

Anexo E. Siembra de bacterias en los medios de cultivo dentro de la cámara de fluido laminar, pagina 61.

Anexo F. Preparación homogénea de la solución madre para el desarrollo de las diluciones seriadas (agua destilada estéril y las muestras de suelo), pagina 61.

Anexo G. Pruebas bioquímicas en tiras Api en donde se determinó si las bacterias son gram positivas o gram negativas, pagina 62.

Anexo H. Tercer muestreo de suelo, figura A sector café, figura B sector bosque secundario y figura C sector de cítricos, pagina 62.

Resumen

El uso desmesurado de agroquímicos ha generado daños sobre el ambiente y la salud humana, por lo que, desarrollar una producción más limpia se hace necesaria para ayudar a reducir dichos problemas. Con esta investigación se busca caracterizar bacterias promotoras de crecimiento vegetal que sean resilientes y tengan efectos antagónicos positivos frente a agentes patógenos y así disminuir el uso de productos de síntesis química. Dentro del género *Fusarium* se destacan las siguientes especies: *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* son los que tienen mayor severidad o pérdidas ocasionadas en distintos cultivos. Se han registrado hasta el 100% de pérdidas según la literatura. De acuerdo con registros tomados en la granja agroecológica Uniminuto se vio plantas afectadas por el género *Fusarium spp*, dentro de los síntomas se evidencio que dicho patógeno generó pudrición en algunas plantas debido al daño que generó en su haz vascular (xilema y el floema). Dentro de las alternativas agroecológicas se busca generar una biorremediación contra el *Fusarium spp* por medio de agentes bacterianos que puedan ejercer efecto antagónico *in vitro*. Para ello, se tomaron muestras aleatorias en tres puntos estratégicos de la granja agroecológica, encontrando 51 aislamientos bacterianos, de los cuales, el 17,6% presentó un efecto inhibitorio frente al aislamiento patogénico de *Fusarium oxysporum* evaluado. Al realizar la caracterización bioquímica y morfológica se determinó que dichos aislamientos correspondían a bacterias benéficas del género *Bacillus* y *pseudomonas*.

Palabras clave: Antagonismo, biorremediación, agroecológico, Bacillus y Fusarium.

Abstract

The excessive use of agrochemicals has caused damage to the environment and human health, therefore, developing cleaner production is necessary to help reduce these problems. This research seeks to characterize plant growth promoting bacteria that are resilient and have positive antagonistic effects against pathogens and thus reduce the use of chemical synthesis products. Within the *Fusarium* genus, the following species stand out: *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* are the ones with the greatest severity or losses caused in different crops. Up to 100% losses have been recorded according to the literature. According to records taken at the UNIMINUTO agroecological farm, plants affected by the *Fusarium* spp genus were seen, within the symptoms it was evident that said pathogen generated rot in some plants due to the damage it generated in its vascular bundle (xylem and phloem). Within the agroecological alternatives, it is sought to generate a bioremediation against *Fusarium* spp through bacterial agents that can exert an antagonistic effect in vitro. For this, random samples were taken at three strategic points of the agroecological farm, finding 51 bacterial isolates, of which 17.6% had an inhibitory effect against the evaluated pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. When performing the biochemical and morphological characterization, it was determined that these isolates corresponded to beneficial bacteria of the genus *Bacillus* and *Pseudomonas*.

Keywords: Antagonism, bioremediation, agroecological, *Bacillus* and *Fusarium*.

Introducción

Los alimentos como factor generador de enfermedades, suponen una carga importante para la salud. Millones de personas enfermaron y muchas más murieron por comer alimentos contaminados, por lo que la Organización Mundial de la Salud, profundamente preocupados, adoptaron una resolución crucial en el año 2000 reconociendo el papel esencial de la inocuidad de los alimentos en la salud pública (Jacha y Celestino, 2017).

Si bien la agricultura es vista como el motor del crecimiento alimenticio, enfrenta nuevos desafíos como la degradación de los recursos naturales. Esto requiere plantear un modelo productivo diferente al heredado de la revolución verde, también conocido como agro-extra-cultura, basado en el desarrollo de monocultivos con productos modificados genéticamente, suelos infértiles, uso intensivo de agroquímicos y ganadería a escala intensificación, creando actividades degradadas oportunistas (Landívar, 2021).

Principalmente en gran parte de las áreas productivas del país la implementación de enmiendas agrícolas al suelo se hace de forma tradicional y sin criterios técnicos, esto ha causado un deterioro en las condiciones del suelo por su mala administración, dado que se ignora las mejoras por parte de las enmiendas en el componente químico en el suelo, a lo largo del tiempo (Quesada, 2021).

La creciente demanda de productos agrícolas para ser utilizados como alimentos y convertidos en bienes de consumo por parte de la sociedad moderna ha llevado a un gran desarrollo de las actividades agrícolas en las últimas décadas. Por lo tanto, la necesidad de implementar métodos permisibles, además de mejorar la eficiencia de los cultivos, minimizar los

impactos adversos en el suelo, reducir la tasa de uso de fertilizantes químicos, con el fin de aumentar las ganancias por área cultivada (Carvajal y Mera, 2010).

Grandes áreas de suelos están siendo contaminadas con metales pesados, como cadmio, zinc y plomo, que se sabe, causan daños a la mayoría de los organismos (Piotrowska-Seget et al., 2005). Los métodos de remediación basados en la ingeniería de suelos contaminados se han vuelto económicamente imposibles para la mayoría de los sitios y han llevado a un mayor crecimiento de remediación de los sistemas biológicos.

Los campos de estudio de la actividad industrial suelen ser suelos pobres caracterizados por pH neutro o ligeramente alcalino, reacciones adversas de carbono a nitrógeno, un bajo contenido de carbono orgánico, así como fósforo, nitrógeno, potasio y macronutrientes (Grobelaket al., 2013; Kacprzak y Bruchal, 2011).

La biorremediación es una técnica que utiliza en gran parte microorganismos como bacterias, hongos, algas o enzimas para biodegradar los contaminantes de los aceites y derivados de hidrocarburos, así como otros contaminantes presentes en el suelo, el aire o el agua. En Latinoamérica se presentan graves problemas de contaminación por lo que diferentes investigadores sugieren que esta tecnología es viable en nuestro territorio debido a que es económica y respetuosa con el medio ambiente en la descomposición de contaminantes (Rodríguez, *et al.*, 2022).

La aplicación de rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas podría desempeñar un rol importante en el desarrollo de métodos que permitan recuperar los suelos. Los microorganismos tienen la capacidad de mejorar la producción de biomasa y la tolerancia de las

plantas a los metales pesados y otras condiciones que se encuentran en la rizosfera (Baharlouei *et al.*, 2011).

Las raíces de las plantas suelen ser colonizadas por bacterias, algunas de estas tienen la capacidad para promover el crecimiento y un mejor desarrollo de la planta, por lo que se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas o PGPR por sus siglas en inglés (Zahir *et al.*, 2004). Las (PGPR) logran por medio de la elongación promover el desarrollo de estas fijando nitrógeno atmosférico, produciendo sideróforos quelantes de hierro y lo ponen a disposición de la raíz.

Los sideróforos tienen una amplia afinidad por el hierro que los quelantes promovidos por microorganismos patógenos presentes en la rizosfera, por lo que el Fe^{3+} deja de estar disponible para los patógenos. Las bacterias PGPR además de todas sus funciones de desarrollo y crecimiento vegetal también logran producir metabolitos secundarios con propiedades antibióticas, antifúngicas, insecticidas e inmunosupresores (Glick, 2005). Las PGPR incluyen bacterias del suelo de vida libre que se encuentran en la zona de la raíz y bacterias endofíticas que colonizan las células de la raíz. El grupo más grande de bacterias PGPR son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Erwinia*. El ácido indolacético (IAA) producido por las bacterias puede potenciar los efectos de la auxina de las plantas y puede afectar directamente el desarrollo radicular al ser estimuladas por la división celular y el alargamiento de la planta (Kalitkiewicz y Kępczyńska, 2008).

La producción agrícola se ve afectada por el uso, a gran escala y sin criterios técnicos, de químicos que contaminan el suelo, lo cual, llevó a la implementación de alternativas limpias como la agroecología, la agricultura orgánica y la agricultura de precisión, que están vinculadas a

la industria del biocontrol, ingredientes indispensables para la producción, control y prevención de plagas y enfermedades en diversos agroecosistemas. Se necesita la voluntad de los agricultores para cambiar los patrones de producción agrícola en todo el mundo (Hidalgo, 2017).

En cuanto a los biocontroladores, se consideran como la base del manejo integrado de plagas y enfermedades, contribuyendo a la protección y conservación de los sistemas agrícolas, generando además una disminución considerable de costos cumpliendo con las medidas fitosanitarias internacionales en apoyo a la conservación y salud ambiental (Duarte, 2012).

Los fertilizantes orgánicos se han planteado como una alternativa que permitirá el reemplazo y/o disminución en la cantidad de los fertilizantes químicos tradicionales, brindando buenos rendimientos en los cultivos, promoviendo el desarrollo saludable de los frutos, controlando plagas y enfermedades, y siendo fácil su método de aplicación. Además, los nutrientes esenciales contenidos en el compost tienen propiedades fisicoquímicas y biológicas que se adaptan al suelo, lo que significa mayores rendimientos en la industria agrícola mundial (Carvajal y Mera, 2010).

CAPÍTULO I

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

Caracterizar las bacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas al cultivo de Café *Coffea* sp, cítricos *Citrus* spp, y plantas de yarumo *Cecropia* sp. que presenten un potencial antagónico *Fusarium* spp., en muestras de la zona de cultivo y del bosque secundario de la granja UNIMINUTO.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto inhibitorio y/o controlador de las bacterias aisladas de la rizósfera frente *Fusarium* spp.
- Determinar en qué zona productiva de la granja se encuentra una mayor densidad de población bacteriana benéfica, según los estudios realizados en el laboratorio.
- Identificar morfológica y bioquímicamente las bacterias con potencial antagónico asociadas a las plantas de yarumo (*Cecropia* sp.), café (*Coffea* sp.), y cítricos (*Citrus* sp.) en la granja UNIMINUTO - Villavicencio

CAPÍTULO II

2 Planteamiento del problema

2.1 Definición del problema

La agricultura que utiliza la tecnología para su productividad necesita en gran parte de la aplicación de insumos químicos, en particular de fertilizantes químicos, plaguicidas y herbicidas. Sin embargo, el uso excesivo de estos puede provocar impactos ambientales no previstos como preocupaciones relativas a la salud del hombre y medio ambientales, afectando considerablemente el microbiota del suelo, y las plantas a su alrededor junto con toda su fauna. Esto ha obligado la búsqueda de alternativas que sustituyan los agroquímicos y demás prácticas perjudiciales para el buen funcionamiento de los cultivos, así como también alternativas para mejorar la calidad del suelo.

Existe una falta de conocimiento de los microorganismos benéficos que habitan el suelo de la granja UNIMINUTO, así como también sus posibles usos en la agricultura, especialmente como alternativa biológica que permitan la sustitución de agroquímicos los cuales generan toxicidad, además de poner en peligro la salud de quienes lo manipulan, y de afectar a los animales y el medio ambiente.

Así pues, esta investigación se hace necesaria, utilizando diferentes métodos para identificar las bacterias rizosféricas de la granja de la UNIMINUTO, capaces de realizar un antagonismo y supresión a enfermedades de importancia económica y a su vez que promuevan el crecimiento de estas, y demás nutrientes requeridos para una buena producción.

2.2 Pregunta de investigación

¿Existen bacterias promotoras de crecimiento vegetal en los suelos de Granja agroecológica Uniminuto?

CAPÍTULO III

3 Justificación

La revolución verde se fijó en gran parte en darle solución a un problema mundial muy importante: ¿cómo alimentar al mundo en crecimiento de manera sostenible? (Zhang et al., 2010). El aumento exponencial de la población humana se combina con un mayor uso de fertilizantes químicos destinados a incrementar la producción agrícola. Sin embargo, el uso excesivo de estos enfoques insostenibles conlleva al deterioro en la salud humana y ambiental (Glick, 2012).

Los fertilizantes químicos pueden provocar el deterioro de las propiedades del suelo, el desequilibrio de las proporciones de nutrientes, el desbalance organoléptico de los alimentos y la destrucción de los entornos ecológicos (Bhattacharyya y Jha, 2012; Mal et al., 2015). Hay varias formas de abordar este gran problema, como cambiar la forma en que usamos los recursos, explorar los recursos renovables y transformar los recursos abióticos en recursos biológicos infinitos.

La producción de alimentos se ven significativamente afectados por ciertos factores bióticos y abióticos que generan estrés a las plantas. Aproximadamente, entre el 20% y el 40% de la reducción del rendimiento de los cultivos y las pérdidas estimadas en 40.000 millones de dólares son causadas por fitopatógenos en todo el mundo (Sivasakthi et al., 2013).

Teniendo en cuenta la creciente preocupación por la seguridad alimentaria mundial, la producción de alimentos debe incrementarse en un 70% hasta 2050 (Ingram, 2011). Entre las alternativas de métodos de control de enfermedades, el biocontrol parece ser una opción eficiente en cuanto al control de patógenos sostenible, rentable y ecológico.

Por tanto, la explotación del potencial biológico intrínseco del ecosistema del suelo podría representar una solución sostenible (Sivasakthi et al., 2013). El empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV o PGPR) (Bashan y Holguin, 1998; RoyChowdhury et al., 2018; Huasasquiche, 2020) se considera un enfoque prometedor para reemplazar las prácticas agrícolas convencionales, en términos de fertilización química y control de agentes patógenos (Kloepper et al., 1980; Glick e Ibid, 1995; Bashan, 1998; Glick et al., 1999; Patten y Glick, 2002). Varios estudios demostraron los diferentes efectos de estos microorganismos sobre los mecanismos abióticos y bióticos del suelo y los ecosistemas vegetales (Saharan y Nehra, 2011). Así mismo, autores como Rodríguez *et al*, 2013 y Abdullah *et al*, 2011, entre otros, señalan que dichos organismos, también denominados microorganismos eficientes, son una gran alternativa, dado que, permiten una amplia gama de aplicaciones en agricultura y producción animal. De ahí la relevancia e este estudio en términos de aislar, caracterizar, y poner disponibles estos recursos naturales presentes en la granja agroecológica UNIMINUTO.

CAPÍTULO IV

4 Marco teórico

4.1 Marco conceptual

La rizosfera, las interacciones y productos generados en esta región.

La destreza de los sideróforos y lipopéptidos para liquidar los fitopatógenos podría ser de gran trascendencia para la agricultura. Ambos dispositivos tienen calidades primordiales en el contraste microbiano, sin embargo, incluso conducen a causar resistencia inducida, conocidas como IRS (Benjumea, 2017).

Según Benjumea 2017, haciendo referencia a Hinsinger y cols, 2005, Las interacciones microbiológicas de las plantas generalmente ocurren en tres lugares de las plantas: la filosfera, la endosfera y la rizosfera. La filosfera se ocupa de las partes aéreas las cuales son: tallo, hojas y flores o frutos y la endosfera con el haz vascular (floema y xilema). La rizosfera, en la que se centra esta investigación, se puede definir como cualquier volumen de suelo que se ve afectado o asociado a las raíces y las sustancias producidas por las plantas.

La elongación de las plántulas en suelos agrícolas es influenciada por muchos factores abióticos y bióticos. Hay una capa delgada de sustrato que cubre las raíces de las plantas y es un lugar extremadamente importante para el intercambio catiónico y el metabolismo de las raíces que se conoce como rizosfera. El concepto rizosfera fue involucrado inicialmente por Hiltner para describir la estrecha región del suelo que rodea las raíces en la que las poblaciones microbianas son estimuladas por la actividad de las raíces. El concepto original ahora se ha extendido al suelo que rodea las raíces, cuyas propiedades físicas, químicas y biológicas han cambiado como

resultado del crecimiento y la actuación de las raíces. En la rizosfera conviven un gran número de microorganismos como bacterias, hongos, algas y protozoos. Las bacterias son las más abundantes entre ellas. Las plantas seleccionan las bacterias que más contribuyen a su aptitud al liberar compuestos orgánicos a través de exudados, lo que crea un entorno muy selectivo donde la diversidad es baja. Dado que los microorganismos más abundantes en la rizosfera son las bacterias, y pueden tener un impacto significativo en la fisiología de las plantas, especialmente porque son competitivas en la formación de colonias en las raíces (Benjumea, 2017).

Los microbios que se acomodan en la rizosfera se clasifican en su función de sus efectos sobre las plantas y su interacción con las raíces, algunos son patógenos mientras que otros desencadenan efectos beneficiosos. Las rizobacterias colonizan las raíces de las plantas y tienen un ámbito positivo desde efectos directos hasta efectos indirectos. Entonces, las bacterias que habitan la rizosfera y son beneficiosas para las plantas se denominan PGPR. En los últimos años, el número de PGPR que se han identificado ha experimentado un gran aumento, principalmente porque el papel de la rizosfera como ecosistema ha ganado importancia en el funcionamiento de la biosfera. Se ha informado que varias especies de bacterias como *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus* y *Pseudomonas* mejoran el crecimiento de las plantas. Actualmente se comercializan varios inoculantes de PGPR que parecen promover el crecimiento a través de al menos un mecanismo; supresión de enfermedades de las plantas (denominadas bioprotectores), mejora de la adquisición de nutrientes (biofertilizantes) o producción de fitohormonas (bioestimulantes) (Glick et al., 1999; Patten y Glick, 2002; RoyChowdhury et al., 2018; Huasasquiche, 2020). El desarrollo de inoculantes ha sido más exitoso para administrar como controlador biológico de enfermedades que

atacan a las plantas, es decir, organismos capaces de matar a otros organismos patógenos o que causan enfermedades a los cultivos.

La exposición al PGPR desencadena una respuesta de defensa del cultivo como si fuera atacado por organismos patógenos. Los sideróforos producidos por algunos PGPR eliminan micronutrientes de metales pesados en la rizosfera (por ejemplo, hierro) que privan a los organismos patógenos de una nutrición adecuada para montar un ataque del cultivo. Las PGPR que producen antibióticos liberan compuestos que previenen el crecimiento de los patógenos. Los laboratorios de Fernando y Daayf están estudiando bioprotectores en el centro de investigación de Ciencias Vegetales de la Universidad de Manitoba (Lugtenberg et al., 2001).

El uso directo de microorganismos para promover el óptimo desarrollo de las plantas y control de plagas sigue siendo un área de investigación en rápida expansión. La colonización de la rizosfera es uno de los primeros pasos en la patogénesis de los microorganismos del suelo. También es crucial para los inoculantes microbianos utilizados como biofertilizantes, agentes de biocontrol, fitoestimuladores y biorremediación. *Pseudomonas* spp. Se utiliza a menudo como modelo de bacteria colonizadora de raíces (Lugtenberg et al., 2001).

Los efectos beneficiosos de estas rizobacterias se han atribuido de diversas formas a su capacidad para producir diversos compuestos (Glick e Ibid, 1995). Las rizobacterias móviles pueden colonizar la rizosfera más profundamente que los organismos inmóviles, lo que resulta en una mejor actividad de transformación de nutrientes. También eliminan las rizobacterias nocivas mediante la exclusión de nichos y, por lo tanto, mejoran el crecimiento de las plantas. Se ha informado que la resistencia sistémica inducida es uno de los mecanismos por los que el PGPR

controla las enfermedades de las plantas mediante la manipulación de las propiedades físicas y bioquímicas de la planta huésped.

El reconocimiento de las (PGPR), un grupo de bacterias beneficiosas, como potencialmente útiles para incrementar satisfactoriamente la elongación vegetal y potenciar el rendimiento de los cultivos, ha evolucionado en los últimos años hasta el punto en el que hoy los investigadores pueden utilizarlas repetidamente con éxito en experimentos de campo. Se ha informado de un mayor crecimiento y rendimiento de la papa, la remolacha azucarera, el rábano y la batata. Se están probando aplicaciones comerciales de PGPR y con frecuencia tienen éxito. Sin embargo, una mejor comprensión de las interacciones microbianas que resultan en aumentos en el crecimiento de las plantas aumentará en gran medida la tasa de éxito de las aplicaciones de campo (Farzana *et al.*, 2009).

Se sabe que las PGPR, las rizobacterias influyen en el mejoramiento de las plantas a través de una variedad de mecanismos directos o indirectos. Varios cambios químicos en el suelo están asociados con PGPR. Se informa que los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR) influyen en el rendimiento y la absorción de nutrientes mediante una serie de mecanismos. Algunas cepas bacterianas regulan directamente la fisiología de las plantas al imitar la síntesis de hormonas vegetales, mientras que otras aumentan el suministro de sustancias inorgánicas y nitrógeno en el sustrato como una forma de aumentar el crecimiento (Farzana, *et al.*, 2009).

Los microbios de vida libre o asociados de la rizosfera pueden estimular el crecimiento de las gramíneas a través de mecanismos, como: la síntesis de reguladores del crecimiento de las plantas, la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, sideróforos y el control de

fitopatógenos en el suelo. Los microorganismos PGPR más estudiados son los géneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*; Algunos de ellos sobreviven al estrés (Loredo, *et al.*, 2004).

Debido a su mecanismo de acción, se necesita investigación básica a nivel bioquímico y molecular para ayudar a dilucidar efectos como la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas y el control biológico de patógenos para aumentar la eficacia de las cepas (Rives, *et al.*, 2007).

Los cultivares de tomate con *Enterobacter sp.* TVL-2 y *P. putida* PSO14 tiene un gran potencial para estimular el crecimiento y la producción de esta planta. El uso de esta bacteria podría ser una alternativa prometedora como biofertilizante para el cultivo y producción de tomate en agricultura sustentable, ya que reducirá el impacto ambiental al disminuir el uso excesivo de fertilizantes sintéticos (Sánchez, *et al.*, 2012).

La colonización de raíces por bacterias PGPR se asocia con un mayor aporte de carbono y humedad en la rizosfera, que se ve afectado por el mucílago de la gramínea. La movilidad microbiana está relacionada con fenómenos como la quimiotaxis, la regulación aeróbica, la adhesión y el movimiento debido a la permeación y/o evaporación del agua (Loredo, *et al.*, 2004).

Según López, Moreira y Benítez en 2021. Las plantas halófitas representan un lugar ideal para el aislamiento de bacterias interesantes, ya que están adaptadas a condiciones extremas, estas bacterias pueden ser analizadas y utilizadas por su capacidad enzimática en investigación y diversas industrias.

La *Salicornia bigelovii* es una halófito que puede producir aceite y alimento para humanos y

animales. Sin embargo, su eficacia depende de un suministro adicional de nitrógeno. Si bien la fertilización con nitrógeno aumenta el rendimiento en suelos salinos, también puede aumentar la salinidad del suelo. Se pueden utilizar adsorbentes útiles como las bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) para reducir la salinidad y promover el crecimiento de *Salicornia bigelovii* (Rueda, *et al.*, 2009).

La actividad antagónica de los microorganismos marinos sugiere que a mediano plazo pueden convertirse en un vehículo contra enfermedades fúngicas fitopatógenas (Hernández, *et al.*, 2018)

Una alternativa es el uso de bacterias estimulantes del crecimiento en plantas que, además de la producción o actividad de inductores de la síntesis de fitohormonas, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, como auxinas y giberelinas (AG3), lo que favorece la brotación, floración y fructificación (Rueda, *et al.*, 2009).

Según Govin, *et al.*, 2019, haciendo referencia a Hazarika, 2019. Los microbios del género *Bacillus spp.* Son conocidos por su capacidad para producir metabolitos con actividad antifúngica, en particular enzimas líticas y lipopéptidos (antibiótico bacteriano), que son antagonistas de muchos patógenos fúngicos.

La bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 inhibió el crecimiento del *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Schltdl, tanto en test in vitro como in vivo en plantas de tomate. Esta cepa estimuló el crecimiento de las plantas y redujo significativamente los síntomas de enfermedades causadas por el agente infeccioso (Govin, *et al.*, 2019).

Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*

Según Villareal, *et al.*, 2018, haciendo referencia a Layton *et al.*, 2011; y Tejera-Hernández *et al.*, 2011, Las principales formas en que estas cepas previenen la formación y el crecimiento de organismos patógenos están los mecanismos, que incluyen A) liberación de antibióticos, B) quelantes de hierro (sideróforos), C) enzimas líticas, D) toxinas y E) inducen inmunidad sistémica en las plantas (IRS).

Figura 1.

Principales mecanismos de control biológico.

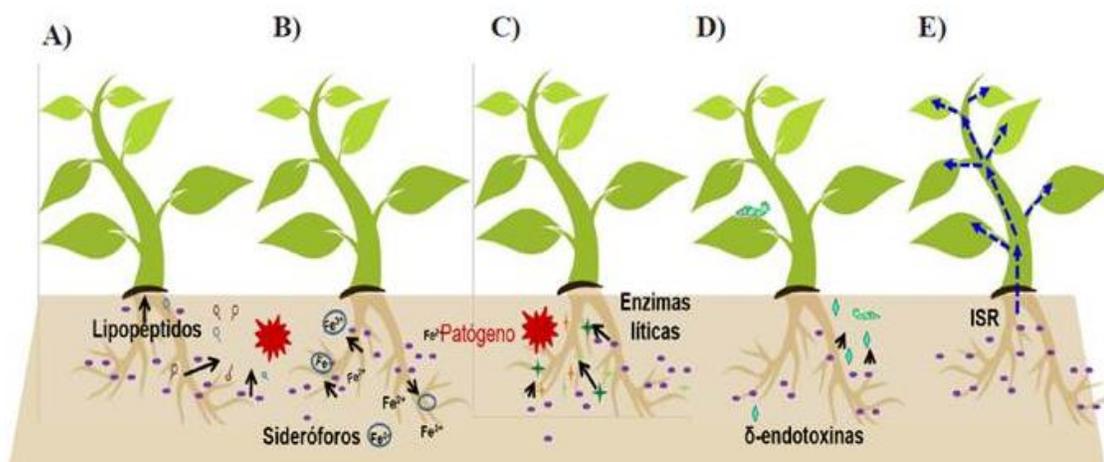


Figura 1. “Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus* y *Pseudomonas*. Producción de A) lipopéptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) δ -endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica.” (Villareal, *et al.* 2018)

Producción de lipopéptidos

Según Villareal, *et al.*, 2018, haciendo referencia a Chowdhury *et al.*, 2015; Meena y Kanwar, 2015, Estas agrupaciones de átomos son simplificadas por complejos multienzimáticos llamados enzimas de péptidos no ribosómicos (NRPS), independientes del ARN mensajero.

Ampliamente se han probado las iturinas, fenginas y surfactinas, por su alta gama de antifúngica y antibacteriana (Figura 2).

Figura 2.

Lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico

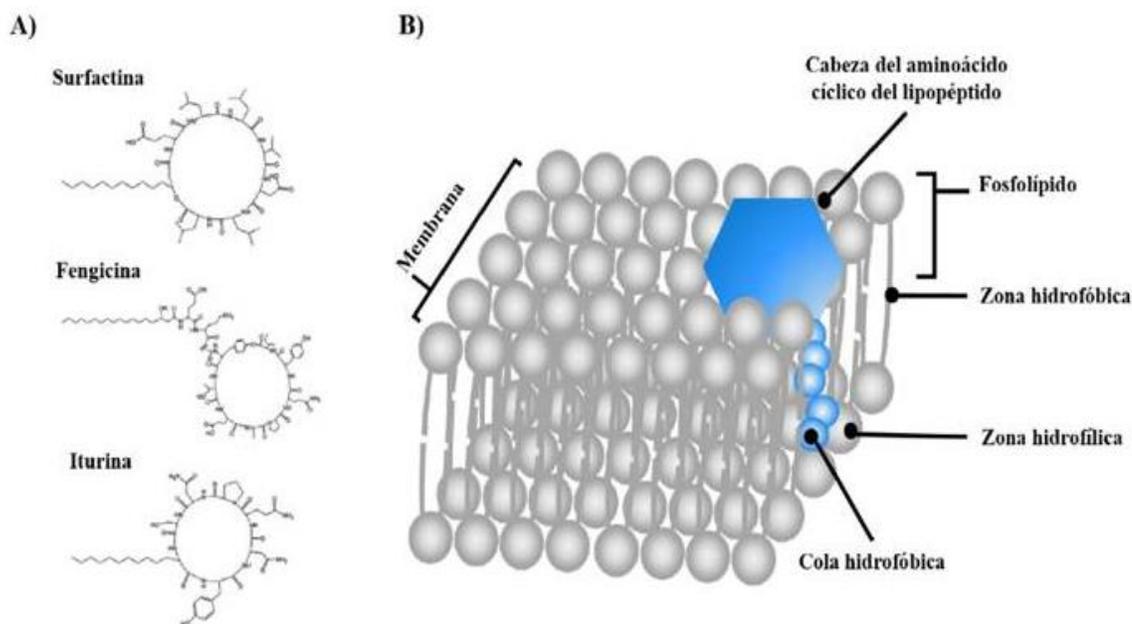


Figura 2. Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) Mecanismo de acción de los lipopéptidos. Tomada de: (Villareal, et al. 2018).

Lo anterior quiere decir que los Lipopéptidos inyectan antibióticos capaces de debilitar la membrana citoplasmática del *Fusarium*, lo que provoca un desequilibrio osmótico e iniciando la muerte celular del fitopatógeno.

Producción de sideróforos

Según Villareal, et al, 2018, haciendo referencia a Scharf et al., 2014, Un gran número de cepas biocontroladoras del género *Bacillus* han demostrado la capacidad de sintetizar compuestos quelantes que regulan la concentración de hierro en el medio a través de su membrana, haciendo este metal inaccesible a los microorganismos patógenos, cuyo desarrollo depende mucho en esta composición (Figura 3).

Figura 3.

Mecanismo de inhibición a fitopatógenos.

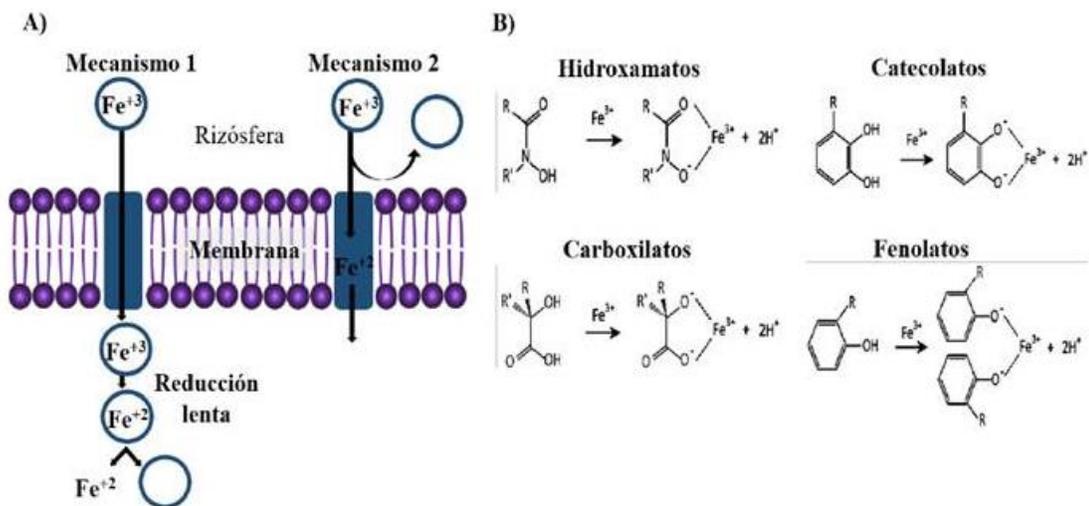


Figura 3. Los sideróforos como mecanismo de inhibición a fitopatógenos. A) Captura y solubilización de hierro, B) principales estructuras quelantes de los sideróforos. Tomada de: (Villareal, *et al.*, 2018).

Este proceso de quelación de hierro no afecta a las plantas porque estas mantienen su desarrollo con bajas concentraciones de hierro, en cambio el patógeno (*Fusarium oxysporum*)

necesita de altas concentraciones para completar su ciclo metabólico y sin hierro en su proceso induce a un lento desarrollo Fito-toxico.

Producción de enzimas líticas

Según Villareal, et al, 2018, haciendo referencia a Bowman y Free, 2006, menciona la producción de enzimas involucradas en la ruptura de la pared celular de factores fitopatógenos, que es uno de los mecanismos de control biológico mejor conocidos, especialmente contra patógenos fúngicos. La pared celular fúngica está compuesta por glicoproteínas, polisacáridos y otros componentes que varían según el hongo.

Aunque Villareal, 2018. Afirma que, los polímeros juegan un papel estructural decisivo en la rigidez de la pared celular debido a una extensa red de enlaces glucosídicos. Así, la interferencia con estas conexiones puede dañar las paredes celulares de los hongos fitopatógenos, provocando la salida de material celular y seguidamente la muerte de este.

Figura 4.

Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos.

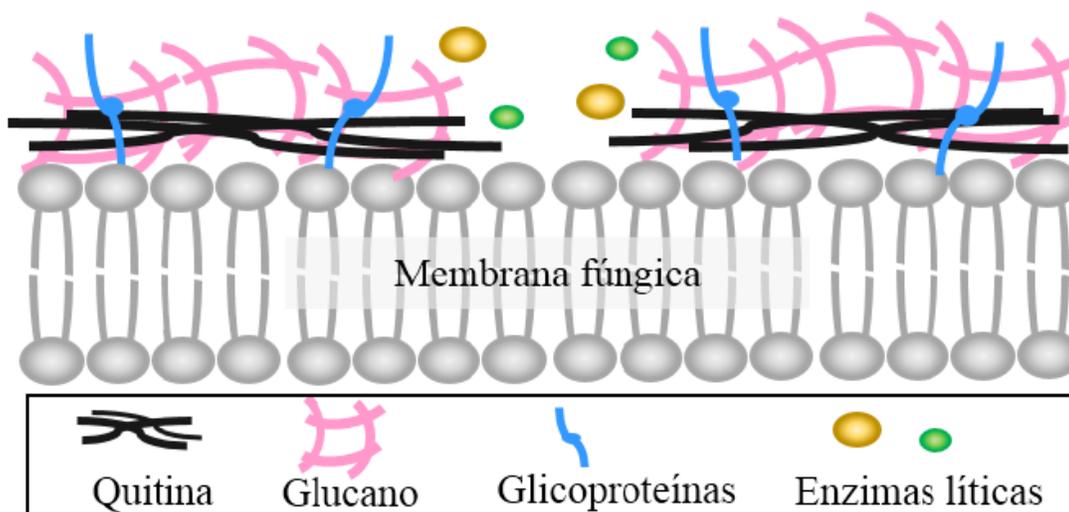


Figura 4. Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos por enzimas líticas. Tomada de: (Villareal, *et al.*, 2018).

Estas enzimas rompen esas fracciones de pliegues de quitina, glucano y glicoproteínas que conforma la pared celular, al fracturar los pliegues ingresa debilitando la membrana fúngica que está conformada de una capa bifosfolipídica lo que permite la interacción directa con la membrana citoplasmática e inducir lisis y muerte celular.

Respuesta sistémica inducida

Según Villareal, et al, 2018, haciendo referencia a Chowdhury et al., 2015, Ryu et al., 2003, Ryu et al., 2003, Kim et al., 2015, los *Bacillus* produce una amplia variedad de moléculas inductoras que responden sistémicamente en las plantas, incluidos los antibióticos (lipopéptidos), fitohormonas y compuestos volátiles.

Los *Bacillus* son capaces de activar múltiples mecanismos de protección por diferentes rutas metabólicas, que se enciende por compuestos volátiles (elicitors) confiriendo resistencia a el hongo *Fusarium oxysporum*.

4.2 Marco legal

Ministerio de salud y protección social, decreto número 1782 de 2014.

Dicho decreto establece en su artículo 245 de la ley 100 de 1993, el gobierno nacional es el encargado de regular el régimen sanitario de los productos que son fiscalizados por el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos), incluidos los medicamentos.

Esa es la proposición transitoria del artículo 89 de la Ley 1438 de 2011 establece que el gobierno nacional dictará normas para la aprobación de productos biotecnológicos y biológicos.

Considerando lo expuesto en el artículo 245 de la ley 100 de 1993. En materia de administración de medicamentos, el Departamento de Salud y Protección Social ha revisado los avances de la legislación comparada y diversas guías técnicas emitidas por la Organización Mundial de la Salud/Organización Interamericana de la Salud de la cual Colombia es miembro, particularmente en el desempeño de la comparabilidad, buenas prácticas de fabricación y farmacovigilancia y la estabilidad de vacunas y productos biológicos.

Departamento administrativo de la función pública, decreto 2078 de 2012.

De esta forma, se establece la estructura del Instituto Nacional de Administración de Alimentos y Medicamentos-Invima y se determinan las funciones de sus filiales.

Funciones de la dirección de medicamentos y productos biológicos:

En el artículo 19 del decreto mencionado que direcciona los alimentos y bebidas, la cuarta función es distribuir instrucciones técnicas para cada programa a cargo de la gerencia, a fin de proceder a su implementación por parte del Departamento Operativo de Salud.

La octava función del artículo 19 del decreto en mención, se relaciona en dirigir, organizar, gestionar, ordenar y controlar, coordinar con las otras direcciones los registros de los productos medicamentos, productos fitoterapéuticos, suplementos dietarios,

productos biológicos y demás a fines a su naturaleza, así como los servicios de información asociados a estos.

La decimoprimer función del artículo 19 del decreto en mención, propone a la dirección genera las normas técnicas que se requiera adoptar por parte del Ministerio de Salud y Protección Social para la evaluación, comercialización, vigilancia de los productos, garantía de calidad, buenas prácticas, procedimientos de vigilancia y control sanitario, en materia de su competencia.

La función decimotercera del artículo 19 del decreto en mención indica que, asesorar, capacitar y prestar asistencia técnica a los entes territoriales, en materia de competencia del área.

Por una parte, la decimocuarta función del artículo 19 del decreto en mención indica que, asesorar y apoyar técnicamente, en coordinación con Oficina de Laboratorios y Control de Calidad, a la Dirección General en la formulación de políticas, directrices, programas, planes y proyectos relacionados con los laboratorios del Invima y la Red de Laboratorios, de acuerdo con las competencias del instituto.

Por otra parte, la decimosexta función del artículo 19 del decreto en mención indica realizar las solicitudes de análisis de los productos de competencia de esta Dirección, para que sean gestionados y practicados por los laboratorios del Invima.

Congreso de la República de Colombia, ley 1196 de 2008.

Esta indica que consientes de los problemas de salud, especialmente en los países en desarrollo, resultantes de la explosión local a los contaminantes orgánicos persistentes, en

especial los efectos en las mujeres y, a través de ellas, en las futuras generaciones.

ARTICULO 1. Teniendo presente el principio de precaución consagrado en el principio 15 de la Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, el objetivo del presente Convenio es proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los contaminantes orgánicos persistentes.

ARTICULO 3, segunda parte “a”. Proteger la salud humana y el medio ambiente tomando las medidas necesarias para reducir a un mínimo o evitar las liberaciones.

CAPÍTULO V

5 Metodología y diseño experimental

5.1 Ubicación geográfica del área de estudio

Tanto los estudios de campo como de laboratorio se realizaron en la granja agroecológica EKONUCOS de la Corporación Universitaria Minuto de Dios- UNIMINUTO, ubicada en la ciudad de Villavicencio-Meta cerca a la vereda Barcelona. ($4^{\circ}04'13\text{N}$ $73^{\circ}35'07\text{W}$ 780 m.s.n.m). En la figura 5 muestra las áreas de la finca de las cuales se recolectaron muestras de suelo de la rizosfera para cada especie de planta evaluada.

Figura 5.

Mapa sitios de muestreo.



Figura 5. Mapa de la granja Uniminuto – sitio de estudio, Zona bosque secundario; Zona Café y Zona cítricos.

5.2 Metodología

Toma de muestra de suelo en campo.

Se realizó un muestreo totalmente aleatorio de suelo proveniente de plantas de yarumo (*Cecropia sp.*, como especie representativa de zona de bosque secundario, café (*Coffea sp*), y cítricos (*Citrus sp*) especies presentes en la granja agroecológica, la selección de estas estuvo basada en la importancia ecológica y su densidad en las diferentes áreas de la granja. De las especies seleccionadas se tomó una muestra de 500 gr de suelo rizosférico que se depositó en bolsas de plástico, se rotuló y conservó en cavas de icopor para su traslado al laboratorio.

Caracterización de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

El tratamiento del suelo en la rizosfera se realizó en un laboratorio de biología ubicado en una finca agroecológica, de la cual se recolectaron 100 g de suelo (Figura 6), y se realizó el aislamiento de bacterias rizosféricas realizado de acuerdo con el procedimiento descrito por Velasco -Belalcázar, con modificaciones (2016), que consta de los siguientes pasos: se colocaron en un matraz Erlenmeyer con 200 ml de agua-destilada-estéril y agitándose durante 1 h para homogeneizar la muestra. Después de la homogeneización, se retiró 1 ml de la solución base y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} , luego se tomaron 40 μ l de diluyente 10^{-7} y se sembraron por triplicado en agar nutritivo (Figura 7). A continuación, las cajas se incubaron a 28 °C durante 24-48 h. Al descubrir las primeras colonias bacterianas, se realizó una identificación morfológica y se transfirieron a otras cajas Petri con medio agar para introducirlas a cultivo puro y como colonias aisladas (Figura 8). Cada aislado bacteriano está

debidamente etiquetado de acuerdo con el siguiente código:

C: Café – B: Bosque, Yarumo – A: Cítricos 1: primer muestreo 2: segundo muestreo

Ejemplo: B1-5 este código corresponde al aislamiento 5 obtenido en el muestreo 1 de las plantas de yarumo en el bosque

Figura 6.

Selección y pesaje de suelo rizosférico.



Figura 6. Selección y pesaje de suelo rizosférico para realizar el aislamiento de colonias bacterianas.

Figura 7.

Aislamiento de bacterias rizosféricas.

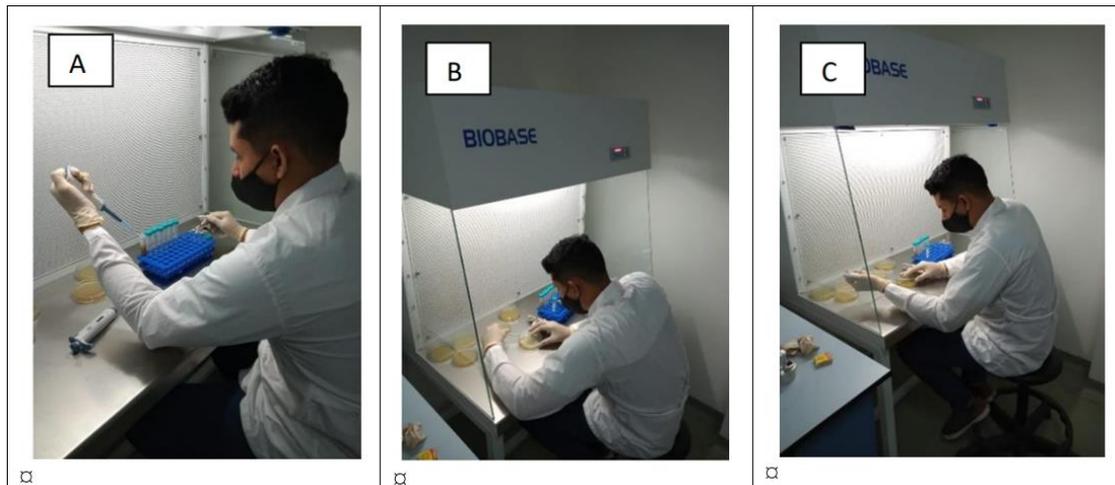


Figura 7. Aislamiento de bacterias rizosféricas: A) Diluciones seriadas; B) Toma de 40 μ L de la dilución para siembra y C) Siembra en cajas con Agar Nutritivo.

Figura 8.

Cultivo puro de bacteria rizosférica (Bacillus sp.).

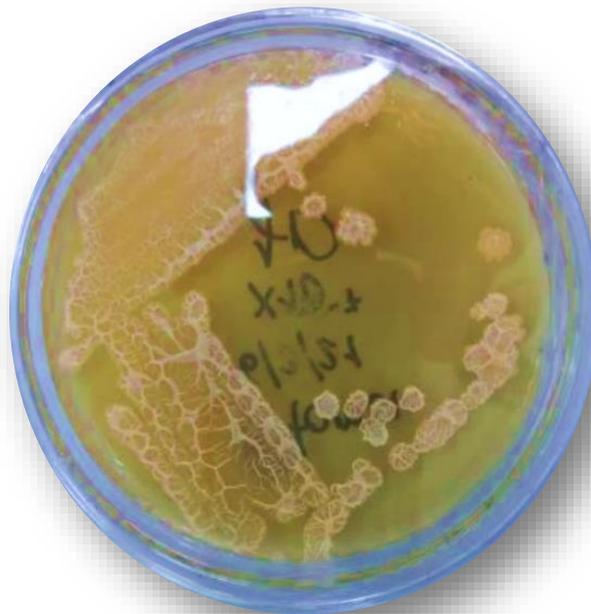


Figura 8. Cultivo puro de bacteria rizosférica (*Bacillus sp.*) obtenida de una planta de Yarumo en el sector del bosque secundario.

Se realizaron las descripciones morfológicas y la identificación mediante pruebas bioquímicas demostradas en el esquema descrito por Schaad et al., 2001; Brenner et al., 2004. Las pruebas bioquímicas realizadas se basaron en las disponibles en los kits de identificación de tiras API 20E y 50CH, además de tinción de Gram, pruebas de oxidasa y otras descritas o solicitadas por los autores anteriormente nombrados.

Selección de aislamientos y pruebas de antagonismo

En las observaciones in vitro del potencial antagonístico de bacterias, se utilizó un aislamiento patogénico de *Fusarium oxysporum* el cual fue obtenido en la granja agroecológica UNIMINUTO, en plantas de ají que se encontraban afectadas por este patógeno.

Los ensayos de antagonismo se realizaron utilizando un método de cultivo dual, incluido el mismo antagonismo de bacterias y patógenos en una placa de Petri (Figura 9). Los patógenos se sembraron en el centro de la placa junto con las bacterias aisladas a una distancia de 3 cm del *Fusarium*. Se utilizaron muestras cultivadas por triplicado en PDA a 28 °C, monitoreando un aumento en la capacidad de aislar el patógeno (Acosta *et al.*, 2007).

$$\% \text{ inhibicion} = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) * 100$$

Donde R2 es crecimiento fúngico en presencia de bacterias y R1 es crecimiento controlado. El comportamiento inhibitorio mostrado por los diferentes aislamientos se agrupó de la siguiente manera: Negativo significa que no hay zona de inhibición o porcentaje inferior al 10% y los patógenos se desarrollan normalmente de forma similar al control, Baja se comprende que la zona de inhibición o 10-39% por ciento y crecimiento reducido de patógenos, Media interpreta la zona de inhibición o porcentaje del 40 al 69% y crecimiento reducido de patógenos y Positivo indica presencia de una cierta zona de inhibición o una tasa del 70 al 100%. Las bacterias con mayor potencial de antagonismo frente a las cepas fúngicas evaluadas se caracterizaron mediante su adecuada identificación (Benítez *et al.*, 2007).

Figura 9.

Prueba de antagonismo.

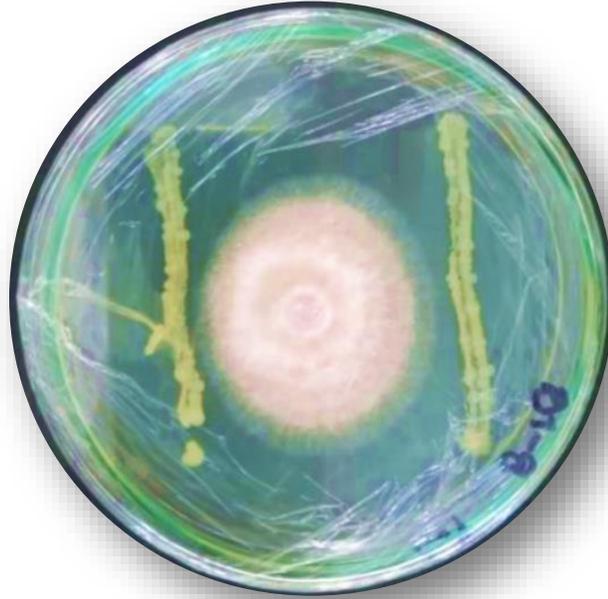


Figura 9. Prueba de antagonismo mediante la técnica de enfrentamiento dual.

CAPÍTULO VI

6 Resultados y discusión

6.1 Resultados

Antagonismos

Se realizaron tres eventos de muestreo por cultivo o especie vegetal, en los cuales se obtuvieron un total de 51 morfotipos o aislamientos bacterianos distintos (**Tabla 1**), asociados a la rizosfera de plantas de los cultivos productivos y bosques asociados a la granja agroecológica Ekonuco de la UNIMINUTO (Corporación Universitaria Minuto de Dios). Cabe señalar que, de los 51 aislamientos obtenidos, 3 presentaron contaminación cruzada y, por lo tanto, no se incluyeron en el siguiente análisis.

Tabla 1.

Relación de aislamientos bacterianos rizosféricos.

Cultivo especie vegetal	–	Aislamientos muestreo 1	Aislamientos muestreo 2	Aislamientos muestreo 3
Yarumo		6	6	9
<i>Cecropia</i>				
Cítricos		5	4	5
<i>Citrus sp</i>				
Café		3	6	4
<i>Coffea sp</i>				

Tabla 1. Relación de aislamientos bacterianos rizosféricos de acuerdo con la especie vegetal y evento de muestreo.

El 17,6% de los aislamientos presentó un efecto inhibitorio frente al aislamiento patogénico de *Fusarium oxysporum* evaluado. De los anteriores, los aislamientos B1-6 (Figura 10) y B1-5 (Figura 11) fueron los que mayor inhibición generaron frente al patógeno, al presentar un porcentaje de inhibición superior al 80%. De igual forma, los aislamientos A1-6 y A1-2 presentaron inhibición entre el 70-79%.

Por otro lado, los aislados con un porcentaje de inhibición categorizado como medio fueron A1-3, C2-3, A3-1, B2-2 y A1-5, respectivamente. Los demás aislamientos presentaron una inhibición baja o negativa.

Figura 10

Enfrentamiento dual, aislamiento bacteriano.



Figura 10. Enfrentamiento dual del aislamiento bacteriano B1-6 frente a *Fusarium oxysporum*, con antagonismo de categoría positiva.

Figura 11.

Enfrentamiento dual, aislamiento bacteriano.

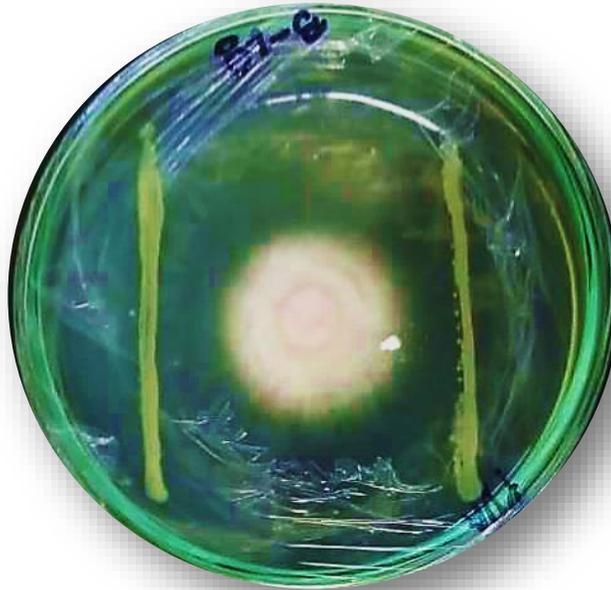


Figura 11. Enfrentamiento dual del aislamiento bacteriano B1-5 frente a *Fusarium oxysporum*, con antagonismo de categoría positivo.

Caracterización morfológica y Bioquímica

De los aislamientos con capacidad antagónica media y positiva frente a *Fusarium oxysporum*, al realizar la caracterización morfológica, se observó que la totalidad presentaron forma de Bacilo.

De esta forma, el 88,9% de las bacterias antagónicas eran Gram positivas, en cambio el otro 11,1% son Gram negativas. De igual forma, al realizar la caracterización bioquímica de las mismas, se observó que el 88,9% de los aislamientos corresponden al género *Bacillus* y los restantes a *Pseudomonas* (**Tabla 2**).

Tabla 2.*Resultados de pruebas bioquímicas.*

Prueba/ Aislamientos	A1-2	A1-3	A1-5	A1-6	A3-1	B1-5	B1-6	B2-2	C2-3
Forma	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Reacción de Gram	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Crecimiento Aeróbico	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento Anaeróbico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporas	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Movilidad	+0-	+0-	+0-	+0-	+0-	+0-	+0-	+0-	+0-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	Oxidativa								
Genero	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>

Tabla 2. Resultados de pruebas bioquímicas básicas utilizadas para la identificación a nivel de género de los aislamientos antagónicos encontrados en la granja agroecológica-UNIMINUTO. Basado en la propuesta de Cowan, ST., y K.J., Steel,1979.

6.2 Discusión

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar qué los aislamientos A1-3, A1-2, A1-5, A3,1 B1-5, B1-6, B2-2, C2-3, tienen las características de cepas del género *Bacillus* y solo un aislado tiene características propias de las cepas pertenecientes a *Pseudomonas* que es el A1-6 (Tabla2). Esta proporción, o que el mayor número de cepas antagónicas corresponda al género *Bacillus*, se debe a una característica sobresaliente de las especies del género anteriormente mencionado, por la capacidad de formar esporas en condiciones ambientales extremas, lo que les permite sobrevivir durante mucho tiempo, en comparación a otros grupos bacterianos como *Pseudomonas* (Ortega *et al.*, 2008).

Los aislamientos A1-3, A1-2, A1-5, A3-1, B1-5, B1-6, B2-2, C2-3 son del género *Bacillus*, por lo que al realizar la caracterización morfológica y bioquímica fue consistente y adecuado que los aislamientos presentaran, forma de Bacilo, fueran Gram positivos, tuvieran crecimiento aeróbico, gran capacidad de formar esporas, contienen catalasa y oxidasa, poca fermentación de glucosa y son oxidativas. Mientras el aislamiento A1-6 del género *Pseudomona*, presentara forma de Bacilo, fuese Gram negativo, crecimiento aeróbico, poca o nula capacidad de formar esporas, contienen catalasa y oxidasa, poca fermentación de glucosa y son oxidativas, estos resultados son congruentes y concuerdan con lo analizado por Cowan, ST., y K.J., Steel, 1979, Schaad *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2004, los cuales son referentes en la identificación de especies bacterianas.

La aplicación de prácticas agrícolas apropiadas para proteger la biodiversidad, la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible de los recursos naturales, sensibilizando a los países desarrollados y en vías de desarrollo desarrollando buenas prácticas que mejoren la

calidad de vida de las personas y eliminen la pobreza extrema, aumentando así el acceso a alimentos de calidad (Beltrán & Cuarán, 2015).

Existen muchas bacterias en el ecosistema del suelo, entre las que podemos encontrar bacterias beneficiosas o antagónicas de vida libre con diferente morfología grampositiva o gramnegativa, capaces de interferir en el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* que destruye las plantas. Se encuentran principalmente en suelos con alto contenido de materia orgánica y ejercen su antagonismo a través de la producción de lipopéptidos, sideróforos y enzimas líticas (Corrales *et al.*, 2014)

Con respecto al potencial antagonista evaluado por porcentaje promedio de inhibición, destaca que la *Pseudomona* sp, obtenida (aislamiento A1-6), tiene capacidad inhibitoria del 70% ante el *F. oxysporum*. Esta acción se fundamenta, de acuerdo a la literatura, en la capacidad de generar sideroforos que actúan como quelantes de hierro y sirve como transporte de hierro de alta afinidad hacia el interior de la célula bacteriana (Valencia *et al.*, 2005), lo cual genera una competencia directa frente al patógeno, el cual requiere dicho elemento para su desarrollo.

La obtención de los B1-5, B1-6, que presenta una inhibición superior al 80%, permite evidenciar que el género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuido en el bosque, en gran parte debido a que este grupo bacteriano se ha encontrado asociado a diversas plantas y sus cepas son muy agresivas con el *F. oxysporum*, gracias a la amplia gama de metabolitos que estas bacterias producen entre los que se encuentran los lipopeptidos, sideroforos, enzimas líticas. Además, incluye producción de fitohormonas, y compuestos capaces de solubilizar fosfatos y fijar otros nutrientes (Rojas *et al.*, 2017).

Las pruebas de siembra de bacterias (PGPR) del bosque presentan mayor antagonismo ante el *Fusarium oxysporum* que las bacterias inoculas de los cultivos de café y cítricos, ¿por qué? La investigación lleva a una breve, pero completa respuesta:

A mayores profundidades, la ubicación de los microorganismos se verá afectada por factores que permitan la coexistencia de ciertas características o condiciones óptimas de humedad y aireación. El exceso de humedad satura los poros y facilita una deficiencia de O₂, por lo que los microorganismos aerobios estrictos, se verán disminuidos. En las capas más profundas de la capa superior del suelo, un mayor número de microorganismos son tolerantes a la deficiencia de O₂ y/o compuestos anaeróbicos en descomposición producidos por los microorganismos más superficiales (Chindoy. 2019).

El hecho que en el bosque se encontraran mayor número de aislamientos, en comparación a los suelos rizosféricos de los cítricos y el café, se debe en gran medida a que el bosque proporciona condiciones ambientales ideales para el desarrollo y proliferación de bacterias y hongos, así como sus interacciones simbióticas y de antagonismo. Para el *Bacillus* siendo una bacteria aeróbica se encuentra en la superficie de la rizosfera de suelos húmedos con buen oxígeno dónde estos generan mayor antagonismo gracias a las condiciones ambientales de este sitio.

La distribución del suelo y los microorganismos es muy heterogénea debido a la interacción de numerosos factores bióticos y abióticos. La presencia de raíces provoca un aumento exponencial de la población bacteriana por la proximidad de las raíces vivas de las plantas que rodean al yarumo en el bosque, efecto conocido como rizosférico, debido a las condiciones edafológicas creadas por las raíces, impulsa la disponibilidad de alimento para microorganismos

(Wall. 2019). De igual forma, los cítricos están ubicados cerca al bosque secundario lo que indica y se confirmó con este estudio, que los aislamientos (PGPR) evaluados presentaron un excelente antagonismo, debido a la cercanía al bosque y todo lo que esto implica en términos de asociaciones simbióticas, diversidad de microorganismos rizosférico benéficos y condiciones ambientales favorables para las bacterias.

Existen otros factores importantes que determinan la distribución y presencia de microorganismos en el suelo. Uno de ellos es el pH. Es bien sabido que los hongos son más fuertes que las bacterias en ambientes ácidos. (Chindoy. 2019). Mencionado lo anterior, en los cultivos de café se dedujo que se encuentra muy pocas bacterias que interactúan en el cafetal por falta de hidratación y por un pH desbalanceado, allí, por la altillanura los suelos son ácidos y además que son lugares intervenidos por la agricultura, siendo favorable para las comunidades fúngicas.

En este estudio, se demostró actividad antagónica con aislados de *Bacillus* y *Pseudomonas* frente al hongo del género *Fusarium Oxysporum* que afecta varios cultivos de la granja Uniminuto, los aislamientos obtenidos en este trabajo surgen como alternativa para cumplir la función de controladores biológicos, además, se quiere continuar con los estudios puesto que estos organismos microscópicos tienen un efecto positivo en el crecimiento y la salud de las plantas, mediante el mecanismo indirecto de combatir a los patógenos como *Fusarium Oxysporum* que pueden atacar a las plantas. Por su actividad funcional, se clasifican como biofertilizantes, bioestimuladores, rizo-remediadoras biopesticidas, con esto nos permite dar un gran paso para fomentar una agricultura limpia con base en la agroecología.

CAPÍTULO VII

7 Conclusión

- Las bacterias caracterizadas en este estudio generan inhibición que va del 40% a alrededor del 80% o más frente a *Fusarium oxysporum*, lo cual se constituyen como un aporte importante en el control de patógenos perjudiciales para los sistemas productivos de la granja Ekonuco – Uniminuto y agricultura mundial.
- La zona de bosque presento el mayor número de aislamientos del género *Bacillus*, así como el mayor número de aislamientos totales entre zonas de estudio, lo cual permite evidenciar la importancia de la rotación de cultivos, la generación de agroecosistemas diversos que permitan el desarrollo de poblaciones microbianas benéficas y evitar el uso excesivo de suelo que aceleren la pérdida de su población microbianas.
- Los aislamientos con capacidad antagónica presentes en la rizosfera de Café (*Coffea* sp), cítricos (*Citrus* spp.) y plantas de yarumo (*Cecropia* sp.) fueron caracterizadas como pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, lo cual es un aporte importante en el conocimiento de la biota de la granja EKONUKOS de UNIMINUTO, dado su importancia ecológica como controladores biológicos de patógenos y su capacidad para promover el crecimiento de diversas especies vegetales.

CAPÍTULO IX

8 Referencias

- Acosta, T., Avellaneda, A., Cuervo, J., & Sánchez, L. (2007). Evaluación de microbiota de tomillo (*Thymus vulgaris*), como aporte al manejo agroecológico de aromáticas en invernaderos de la universidad nacional En: Universidad Nacional de Colombia. *Perspectivas del agronegocio de hierbas aromáticas culinarias y medicinales*. Ed, 1, 135-138.
- Abdelkrim, S., Jebara, S. H., Saadani, O., Abid, G., Taamalli, W., Zemni, H., Mannai, K., Louati, F., & Jebara, M. (2020). In situ effects of *Lathyrus sativus*- PGPR to remediate and restore quality and fertility of Pb and Cd polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 192, Issue September 2019). Elsevier Inc. Tomado de: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110260>
- Amna, Xia, Y., Farooq, M. A., Javed, M. T., Kamran, M. A., Mukhtar, T., Ali, J., Tabassum, T., Rehman, S. ur, Hussain Munis, M. F., Sultan, T., & Chaudhary, H. J. (2020). Multi-stress tolerant PGPR *Bacillus xiamenensis* PM14 activating sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) red rot disease resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 151). Tomado de: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.016>
- Beatriz Sánchez López, D., Milena Gómez-Vargas, R., Fernanda Garrido Rubiano, M., & Rebeca Bonilla Buitrago, R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *cienciasagricolas.inifap.gob.mx* (Vol. 3). Tomado de: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/1346>

- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Consuelo Sánchez, L., & Corrales, L. (2017). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del. *hemeroteca.unad.edu.co*. Tomado de: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/383>
- Camilo, C., & Moreno, Q. (2022). *Evaluación correctiva de carbonatos, óxidos y silicatos de calcio y/o Mg en un suelo oxisol*. Tomado de: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/4513>
- Chindoy L, E. R. (2018). *Caracterización de la actividad fúngica y bacteriana sobre los suelos de diferentes sistemas productivos del pie de monte llanero en la Universidad de llanos Villavicencio – Colombia*. Tomado de: <https://repositorio.unillanos.edu.co/handle/001/1371>
- Constanza, L., Ramírez, C., Consuelo, L., Leal, S., Yurieth, Z., Galvez², A., Estefanía, V., & Burbano², M. (2014). *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities. *scielo.org.co*. Tomado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702014000200006&script=sci_abstract&tlng=pt
- Cordero Elvia, J., Ortega-Rodés, P., & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *revistas.unal.edu.co*. Tomado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/1151>
- De Sevilla, U., & Benjumeda Muñoz, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones*. Tomado de: <https://idus.us.es/handle/11441/65140>

Decreto 1782 de 2014 (Presidencia de la República). Por medio de la cual se reglamenta el artículo 245 de la ley 100 de 1993. Septiembre 07 de 2014.

https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Decreto%201782%20de%202014.pdf

Decreto 2078 de 2012 (Presidencia de la República). Por medio de la cual se reglamenta el artículo 54 de la ley 489 de 1998. Octubre 08 2012.

https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma_pdf.php?i=66709

Duarte Cueva, F. (2012). El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. *The biological control as a strategy to support nontraditional agricultural exports in Peru: An empirical analysis*. (Vol. 7, Issue 14). Tomado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2816/281624914006.pdf>

Gallardo, N., & Cuarán, F. (2015). La Agricultura Familiar en la parroquia Olmedo del Cantón Cayambe-Ecuador 2014. *Universidad Politécnica Salesiana SEDE Quito*. Tomado de: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9221>

Govin Sanjudo, A., Leal Sanabria, G., & López Hernández, D. (2019). Actividad antagónica de bacterias endófitas de *Leucocroton havanensis* Borhidi frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* (Vol. 34, Issue 2). Tomado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522019000200006&script=sci_arttext&tlng=pt

Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering* (Vol. 84). Tomado de: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.019>

- Hernández Montiel, L. G., Rivas García, T., Romero Bastidas, M., Chiquito Contreras, C. J., Ruiz Espinoza, F. H., & Chiquito Contreras, R. G. (2018). Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Tomado de: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1000>
- Hidalgo, J. (2017). *La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola: El sector florícola ecuatoriano*. Tomado de: <https://repositorio.uasb.edu.ec/handle/10644/6095>
- Ley 1198 de 2008. Por medio de la cual se aprueba el "Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes". Junio 05 de 2008. DO. No 47011. http://www.secretariassenado.gov.co/senado/basedoc/ley_1196_2008.html
- Li, H., Qiu, Y., Yao, T., Ma, Y., Zhang, H., & Yang, X. (2020). Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil and Tillage Research* (Vol. 199). Tomado de: <https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104577>
- López Benítez, Y. A., Moreira, L. M., & Benítez Rodas, G. A. (2021). Bacteria associated with *Sarcocornia neei* (Lag.) With apparent hydrolytic activity and biological control from the Paraguayan dry Chaco. *Reportes científicos de la FACEN* (Vol. 12, Issue 1). Tomado de: <https://doi.org/10.18004/rcfacen.2021.12.1.21>
- Loredo-Ostil, C., López-Reyes, L., & Espinoza-Victoria, D. (2004). Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal Asociadas Con Gramíneas: Una Revisión. *Terra Latinoamericana* (Vol. 22, Issue 2). Tomado de: <https://www.redalyc.org/pdf/573/57322211.pdf>

- Muñoz, J. S. C., & Benavides, A. C. M. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + limpia* (Vol. 5, Issue 2). Tomado de: <http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/handle/10567/94>
- Pedro, Z., & Ayala, J. (2018). *Función antibacteriana del extracto puro de bulbo de allium sativum-l sobre grampositivos y gramnegativos*. Tomado de: <http://revistas.unheval.edu.pe/index.php/riv/article/view/128>
- Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales* (Vol. 56, Issue 1). Tomado de: <https://doi.org/10.15359/rca.56-1.9>
- Rojas Badía, M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K., & Lugo Moya, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal* (Vol. 32, Issue 2). Tomado de: <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/879>
- Romero, T. de J., & Vargas, D. (2017). Uso de microorganismos eficientes para tratar aguas contaminadas. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental* (Vol. 38, Issue 3). Tomado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1680-03382017000300008
- Rueda-Puente, E. O., Villegas-Espinoza, J. A., Gerlach-Barrera, L. E., & Tarazón-Herrera, M. A. (2009). Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*. *Terra Latinoamericana* (Vol. 27). Tomado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-57792009000400009&script=sci_arttext

Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review.

Life Sciences and Medicine Research (Vol. 2011). Tomado de:

<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=58484da6404854b7f44ed68b&as&setKey=AS%3A436719616040960%401481133478064>

Sánchez Sánchez, G. L., Gil Garzón, M. J., Gil Garzón, M. A., Giraldo Rojas, F. J., Millán

Cardona, L. de J., & Villada Ramirez, M. eugenia. (2012). Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes.

Produccion + limpia (Vol. 4, Issue 2). Tomado de:

https://www.researchgate.net/profile/Maritza-Gil/publication/277045268_Aprovechamiento_del_suero_lacteo_de_una_empresa_del_norte_antioqueno_mediante_microorganismos_eficientes/links/5d7f9b28299bf10c1ab12e49/Aprovechamiento-del-suero-lacteo-de-una-empresa-del-norte-antioqueno-mediante-microorganismos-eficientes.pdf

Scagliola, M., Pii, Y., Mimmo, T., Cesco, S., Ricciuti, P., & Crecchio, C. (2016).

Characterization of plant growth promoting traits of bacterial isolates from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare L.*) and tomato (*Solanum lycopersicon L.*) grown under Fe sufficiency and deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 107). Tomado de:

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.002>

Sivasakthi, S., Usharani, G., y Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review.

African Journal of Agricultural Research (Vol. 9, Issue 16). Tomado de:

<https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/0C9E6A243974>

- Torrens, H. de la C. R., Argilagos, G. B., Valdés, A. B., & Oca, R. V. M. de. (2013). Los microorganismos eficientes como promotores del crecimiento en los cerdos hasta el destete. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* (Vol. 14, Issue 9). Tomado de: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63632376004.pdf>
- Valencia-Cantero, E., Villegas-Moreno, J., Sánchez-Yáñez, J. M., Peña-Cabriales, J. J., & Farías-Rodríguez, R. (2005). Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana* (Vol. 23, Issue 1). Tomado de: <https://www.redalyc.org/pdf/573/57323111.pdf>
- Velasco, M. (2016). Caracterización de bacterias antagónicas a *Fusarium sp*, asociadas a *Capsicum frutescens* en Guacarí y Bolivar, Valle del Cauca. *UNC*. Tomado de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56917>
- Landivar Albis, F. X. (2021). *El efecto del sistema agroforestal en la unidad familiar productiva frente a otros sistemas de producción en le amazónico Boliviano* (Doctoral dissertation). Tomado de: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/27039/T-2642.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology* (Vol. 36, Issue 1). Tomado de: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Wall. (2019). *La ecología microbiana y la agricultura - Horizonte A Digital*. Tomado de:

<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/135423>

CAPÍTULO IX

9 Anexos



Anexo A. Fluorescencia de la bacteria A1-6, en medio King B, perteneciente a *Pseudomonas sp* de la granja UNIMINUTO observadas en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario.



Anexo B. Enfrentamiento dual bacterias antagónicas frente al hongo patógeno *Fusarium oxysporum*.



Anexo C. Siembra por estría de la bacteria A1-1 (Sector café, bacteria 1, primer muestreo).



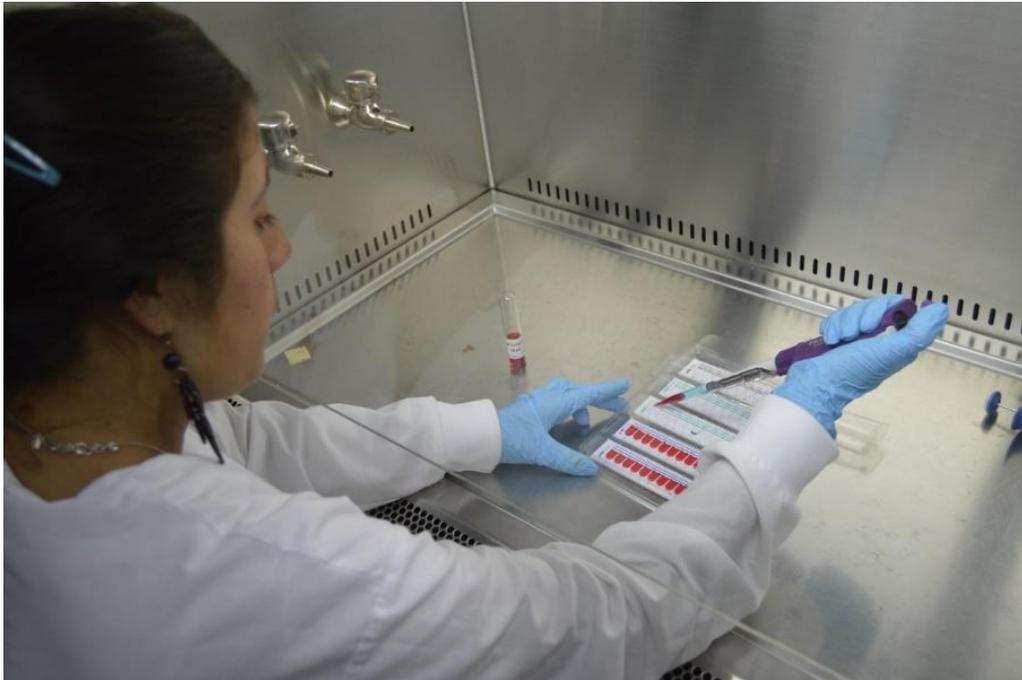
Anexo D. Siembra por agotamiento de la bacteria B2-1 (Sector bosque, bacteria 2, primer muestreo).



Anexo E. Siembra de bacterias en los medios de cultivo dentro de la cámara de flujo laminar.



Anexo F. Preparación homogénea de la solución madre para el desarrollo de las diluciones seriadas (agua destilada estéril y las muestras de suelo).



Anexo G. Pruebas bioquímicas con tiras API 50CHB en las instalaciones del ICA.



Anexo H. Tercer muestreo tomas de suelo, figura A sector café, Figura B sector bosque secundario y figura C sector de cítricos.