

BACTERIAS DIAZOTROFICAS Y SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO AISLADAS DE LAS ESPECIES FORESTALES ALTOANDINAS COLOMBIANAS *Weinmannia tomentosa* Y *Escallonia myrtilloides*

DIAZOTROPHIC AND PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA ISOLATED FROM *Weinmannia tomentosa* AND *Escallonia myrtilloides* COLOMBIA'S HIGH ANDEAN FOREST SPECIES

Patricia Martínez-Nieto y Daniel G. García-González

RESUMEN

El encenillo (*Weinmannia tomentosa* L.f) y la pagoda (*Escallonia myrtilloides* L.f) son especies forestales nativas predominantes en bosques altoandinos del complejo Guerrero (Cundinamarca, Colombia). De la rizosfera de estos árboles se aislaron 42 bacterias solubilizadoras de fósforo y 125 fijadoras de nitrógeno, de las cuales se escogieron las cepas microbianas que presentaron los cinco mejores resultados de disolución de fosfato y reducción de acetileno por cada especie vegetal. Las cepas diazotróficas escogidas se identificaron como cercanas a *Enterobacter gergoviae*, *Alcaligenes* sp. (Cepas E12E y E13C), *Enterobacter* sp (cepa E14C.2), *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Paenibacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Flavobacterium odoratum* y *Klebsiella pneumoniae*; y como solubilizadoras de fósforo a *Pantoea agglomerans*, *Pantoea* sp., *Brevudimonas* sp., *Enterobacter* sp. (Cepa E6C.1), *Burkholderia cepacia*, *Arthrobacter* sp., *Aeromicrobium* sp., *Corynebacterium* sp., *Pimelobacter* sp. y *Micrococcus* sp. Se realizaron ensayos preliminares *in vivo* con los microorganismos escogidos y se inocularon diferentes combinaciones bacterianas en plántulas de encenillo y pagoda. Se evaluó el crecimiento longitudinal durante tres meses bajo condiciones de invernadero. Los mayores promedios se obtuvieron con la inoculación de *Enterobacter gergoviae* y *Pantoea* sp., en plántulas de encenillo (incremento promedio de 51% y 57% más que los controles sin ninguna inoculación microbiana y medio melaza estéril, respectivamente) y con la mezcla de todas las bacterias escogidas en pagoda (estimulación de 16% y 32%, con respecto a los controles melaza y sin inoculación bacteriana, respectivamente). Todas las combinaciones microbianas utilizadas estimularon significativamente el crecimiento longitudinal (prueba de Duncan $P < 0,05$). El sinergismo mostrado por la co-inoculación de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo indican el potencial de estos microorganismos como promotores de crecimiento vegetal y posibles biofertilizantes.

PALABRAS CLAVE: Bacterias diazotróficas, biofertilización, Bosque Altoandino, microorganismos solubilizadores de fosfato, reforestación, sinergismo.

Dirección de los autores:

Laboratorio de Microbiología de la Finca Tisquesusa. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, CAR. Subdirección de Patrimonio Ambiental. Vereda Moyano, vía Madrid-Facatativá (Cundinamarca, Colombia). *Calle 142 No 13-49 interior 2. Conjunto Residencial "El Pórtico". Teléfono: 2 58 42 86. patingli@gmail.com. (P.M-N., D.G.G-G)



ABSTRACT

Encenillo (*Weinmannia tomentosa* Lf) and pagoda (*Escallonia myrtilloides* Lf) are dominant native tree species that can be found in the forests of the complex Andean Guerrero (Cundinamarca, Colombia). Forty two phosphorus-solubilizing bacteria and 125 nitrogen-fixing strains were isolated from the rhizosphere of these trees, out of which the microbial strains presenting the best five results of dissolution of phosphate and acetylene reduction by plant species were selected. The diazotrophic strains selected were identified as close to *Enterobacter gergoviae*, *Alcaligenes* sp. (E13C and E12E strains), *Enterobacter* sp. (E14C.2 strain), *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Paenibacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Flavobacterium odoratum*, and *Klebsiella pneumoniae*, and as phosphate-solubilizing bacteria near to *Pantoea agglomerans*, *Pantoea* sp., *Brevudimonas* sp., *Enterobacter* sp. (E6C.1 strain), *Burkholderia cepacia*, *Arthrobacter* sp., *Aeromicrobium* sp., *Corynebacterium* sp., *Pimelobacter* sp. and *Micrococcus* sp. In order to perform preliminary *in vivo* tests with the chosen microorganisms, it was inoculated bacterial mixture to encenillo and pagoda seedlings and evaluated their longitudinal growth for three months under greenhouse conditions. The major averages were obtained with the inoculation of *Enterobacter gergoviae* and *Pantoea* sp. in encenillo seedlings (average increase of 51 % and 57 % greater than the controls without microbial inoculation and sterile molasses medium, respectively) and the mixture of all selected bacteria in pagoda (Stimulation of 16% and 32% compared to controls molasses and without bacterial inoculation, respectively). The results showed that all the combinations using microbial inocula significantly stimulated longitudinal growth (Duncan multiple range test $P < 0.05$). The synergism shown by co-inoculation of diazotrophic bacteria and phosphate solubilizing bacteria indicate the potential of these microorganisms as plant growth promoters and biofertilizers.

KEY WORDS: Diazotrophic bacteria, bio-fertilizers, High Andean forest, phosphate-solubilizing microorganisms, reforestation, synergy.

INTRODUCCIÓN

Los Bosques Altoandinos y Páramos colombianos se están reduciendo, fragmentando y/o degradando, principalmente por actividades agropecuarias, deforestación con introducción de especies exóticas, minería y establecimiento de cultivos ilícitos (Alarcón et al., 2002; Martínez-Nieto, 2002; CAR, 2009). El impacto de la intervención antrópica y el cambio climático en los Páramos alteran los ciclos hidrológico y de nutrientes, generando erosión, sedimentación, pérdida de la capacidad productiva de los suelos, disminución de la retención y regulación del agua, entre otros (Martínez-Nieto, 2002; Gómez-Sánchez, 2009).

En la restauración de ecosistemas, los microorganismos son indicadores muy sensibles y su aumento está relacionado con la recuperación de zonas degradadas y el restablecimiento de los ciclos biogeoquímicos. Es de suponer que

en suelos deforestados no se encuentran los microorganismos que establecen relaciones benéficas con las plantas, o estos se encuentran muy disminuidos, dificultando el establecimiento de las especies vegetales (Barreto et al., 2007; Carreira et al., 2008).

Los procesos de fijación de nitrógeno atmosférico y solubilización de fosfatos por microorganismos que crecen en ecosistemas forestales son muy importantes, y estos representan el 5 y 30% respectivamente de la microbiota total cultivable (Mikanoka y Novakova, 2002; Pengnoo et al., 2007; Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009). En algunos países se ha trabajado con éxito en mezclas de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo para la producción en vivero de plántulas de especies forestales (Rodin et al., 1997; Muthukumar et al., 2001; Gomes et al., 2010). Además, estas bacterias al ser usadas en la regeneración artificial de bosques, incrementan el desarrollo de coníferas (Chanway et al., 2000).

El uso de estos microorganismos sería de gran ayuda en los programas de restauración ecológica de los ecosistemas degradados en Colombia; sin embargo, en nuestro país son escasas las publicaciones sobre microorganismos solubilizadores de fosfatos, productores de hormonas de crecimiento y fijadores libres de nitrógeno (diferentes a *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp.) en especies forestales (Deaza y Mesa, 1996; Jiménez, 1996; Parra 1996; Urrego-Layton et al., 2006; Barreto et al., 2007; Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009). En suelos del trapecio amazónico colombiano Mantilla-Paredes et al. (2009) evaluaron la abundancia y distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno, encontrando una influencia directa del paisaje sobre el número de estos microorganismos, con un mayor recuento en los suelos con cobertura de bosque y de llanura inundable.

En el altiplano cundiboyacense colombiano, a pesar del alto grado de degradación de los ecosistemas, existen muchas zonas estratégicas por los bienes y servicios ambientales que prestan y que fueron declaradas como áreas protegidas con el fin de conservar y restaurar (Morales et al., 2007; CAR, 2009). Este es el caso del área de protección especial de Pantano redondo, que se encuentra dentro del complejo de Páramos de Guerrero, al norte de Cundinamarca (Morales et al., 2007). Área donde predominan pagoda, siete cueros rojo (*Tibouchina grossa* L.f) y otras especies como cucharo (*Clusia multiflora* H.B.K), ají de páramo (*Drimys granadensis* L), encenillo y chusque (*Chusquea scadens* Kunth) (Rodríguez y Urrego, 2003; Morales et al., 2007; Ortiz y Reyes, 2009)

La especie nativa encenillo localizada entre los 2.500 y 3.600 msnm, es importante en la inducción de rastrojo y recuperación de bosques de laderas; mientras pagoda que predomina entre los 3.200 y 3.600 msnm, es esencial en la protección de márgenes hídricos, pantanos y recuperación de bosques de ladera en Páramos húmedos (DAMA, 2000; MAVDT, 2003). Encenillo y pagoda fueron caracterizadas como especies con dificultades para su establecimiento, reproducción vegetativa y crecimiento dentro del programa de reforestación biodiversificada de ecosistemas de

alta montaña de la CAR (Bartholomaeus et al., 1990; Montenegro y Vargas, 2008). Por lo cual se adelantó la presente investigación tendiente a evaluar microorganismos rizosféricos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo aislados de encenillo y pagoda; con el fin de implementar tecnologías ambientalmente racionales de fertilización que favorezcan su crecimiento, desarrollo y mejoren la calidad del ambiente edáfico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos de suelo rizosférico y rizoplano de las especies nativas encenillo y pagoda se realizaron en los bosques de alta montaña ubicados en los alrededores de la granja San Benito, ubicada en el área de protección especial de Pantano Redondo al noroccidente del municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). Las muestras se tomaron teniendo en cuenta las normas del Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación -ICONTEC- (2004).

Cultivo y aislamiento microbiano

Las muestras fueron procesadas utilizando para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas medios líquidos, sin ningún compuesto nitrogenado y con adición de diferentes azúcares como fuente de carbono (glucosa y malato de sodio) y para las solubilizadoras de fósforo medios sintéticos, con una fuente de fósforo insoluble, el fosfato tricálcico (medios SRS y Picoscakaya) (Carrillo et al., 1998; Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009). Luego de incubar a 15 ± 2 °C en condiciones aerobias, entre dos a ocho días, se realizó un pase ciego a los medios sólidos correspondientes (los mismos medios líquidos pero agregando agar - agar al 1,5 %), hasta el aislamiento de las diferentes colonias. La pureza de los cultivos se efectuó con base en las características macro y microscópicas presentadas durante los diferentes pases realizados, desde su aislamiento en los medios descritos anteriormente, como también en agar nutritivo, agar Mac Conkey y agar glucosa-extracto de levadura.

Solubilización de fósforo

Para determinar la capacidad de disolución de fosfato tricálcico, inicialmente se hizo una clasificación preliminar de acuerdo a la asimilación de fosfato insoluble observada en las cajas de petri, mediante halos transparentes alrededor de la colonia (Bohórquez, 1999). Posteriormente, se estandarizó una prueba semicuantitativa de solubilización basada en la técnica de anillos utilizada para pruebas de antagonismo adaptada por Martínez et al., 2003, pero empleando como medio de cultivo base SRS, medio empleado para el crecimiento de microorganismos solubilizadores de fosfato de acuerdo con lo descrito por Carillo et al., 1998 y se determinó el radio del halo de solubilización (mm) a las 48 y 168 horas. Este tiempo se tomo con base en el crecimiento bacteriano observado en el aislamiento sobre medios sólidos.

Determinación de la capacidad diazotrófica *in vitro*

La presencia del complejo enzimático nitrogenasa presente en los microorganismos fijadores de nitrógeno, se determinó mediante el ensayo de reducción de acetileno a 35 bacterias aisladas de encenillo y 29 de pagoda. La atmósfera de los tubos con cultivos bacterianos (medio libre de nitrógeno con malato de sodio como fuente de carbono) se reemplazo por 10 % de acetileno producido en el laboratorio y se leyó a las 3 horas en un cromatógrafo de gases Modelo 3920 Perkin Elmer (Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009). La concentración de etileno se expresó en nmol mL⁻¹ al reemplazar la ecuación (coeficiente de correlación de 0,996): $\text{Log } X: (\text{Log } Y-21,95)/2,224$; donde X es la concentración de etileno y Y la altura del pico obtenido en el cromatograma. La concentración inicial del patrón de etileno utilizado para elaborar la curva de calibración por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) fue de $3,14 \times 10^{-5}$ mol mL⁻¹. A partir de esta concentración, CORPOICA hizo cinco diluciones seriadas teniendo en cuenta la presión atmosférica del sitio donde se estaba trabajando y la ley de los gases ideales.

Selección de microorganismos

Las bacterias que presentaron los cinco mejores halos de solubilización de fosfato y producción de etileno por especie forestal se escogieron para realizar pruebas de antagonismo, las cuales se codificaron con letras del abecedario en orden decreciente de solubilización de fosfato. Los microorganismos fijadores de nitrógeno se codificaron con números de 1 al 10 en orden decreciente de actividad de la nitrogenasa.

Identificación preliminar de las cepas microbianas escogidas

Las bacterias escogidas para el ensayo *in vivo* se identificaron mediante el sistema BBL Cristal ID (Becton Dickinson) y pruebas bioquímicas convencionales para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas no fermentadoras o fermentadoras (Brenner et al., 2005).

Antagonismo

Con el fin de evaluar si las cepas escogidas según su capacidad diazotrófica y de disolución de fosfatos presentaban o no inhibición de crecimiento, y poder utilizar estas bacterias en diferentes mezclas en el ensayo *in vivo*, se emplearon las técnicas de anillos y estrías, con lectura a las 48 horas en agar nutritivo y agar Topping (Martínez et al., 2003).

Ensayo *in vivo* para evaluar el efecto inicial sobre el crecimiento longitudinal de las especies forestales encenillo y pagoda

Especies forestales. Se emplearon plántulas de encenillo y pagoda con una longitud promedio entre 3 y 6 cm, obtenidas bajo condiciones de invernadero. Estas se trasplantaron a bolsas medianas con suelo y arena estéril (3:1).

Microorganismos. Se prepararon inóculos bacterianos a una concentración entre 10^8 y 10^{10} UFC/ml (Orozco-Jaramillo y Martínez-

Nieto, 2009). Se utilizó para cada tratamiento diferentes mezclas de las cinco bacterias solubilizadoras de fósforo y diazotróficas que presentaron los mejores resultados en cuanto a halos de disolución y reducción de acetileno en las dos especies forestales y que no presentaron antagonismo entre sí.

Sistema de Inoculación. Una vez tomado el crecimiento inicial de las plántulas se procedió a inocular el suelo con 5 mL de las suspensiones bacterianas según tratamiento. Se realizó una segunda y tercera inoculación con intervalos de un mes.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el ensayo *in vivo* realizado para evaluar el efecto inicial sobre el crecimiento de encenillo y pagoda de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de estas especies forestales.

ESPECIE FORESTAL	TRATAMIENTOS (T)
ENCENILLO	T1 MEZCLA BACTERIAS 1 + A
	T2 MEZCLA BACTERIAS 1 + B
	T3 MEZCLA BACTERIAS 2 + A
	T4 MEZCLA BACTERIAS 2 + B
	T5 MEZCLA BACTERIAS 1 + 2 + A + B
	T6 MEZCLA TOTAL ESCOGIDAS: 10 ENCENILLO + 10 PAGODA
	T7 MEDIO ESTÉRIL
	T8 SUELO NO INOCULADO
PAGODA	T1 MEZCLA BACTERIAS 6 + F
	T2 MEZCLA BACTERIAS 6 + G
	T3 MEZCLA BACTERIAS 7 + F
	T4 MEZCLA BACTERIAS 7 + G
	T5 MEZCLA BACTERIAS 6 + 7 + F + G
	T6 MEZCLA TOTAL ESCOGIDAS: 10 ENCENILLO + 10 PAGODA
	T7 MEDIO ESTÉRIL
	T8 SUELO NO INOCULADO

Distribución del ensayo. El ensayo se distribuyó en dos diseños completos al azar para cada especie; con ocho tratamientos, tres repeticiones y cinco unidades experimentales por repetición (Tabla 1).

El incremento en el crecimiento longitudinal (cm) de los árboles se midió durante tres meses, res-

tando del crecimiento al momento de trasplantar cada unidad experimental, el obtenido al final del experimento (Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009). Las mediciones se hicieron cada 15 días para pagoda y mensualmente para encenillo.

Análisis estadístico. Se utilizó análisis de varianza de una sola vía. La diferencia entre tratamientos se hizo mediante la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Cultivo y aislamiento microbiano

En la rizosfera y rizoplano de 30 árboles de encenillo y pagoda se aislaron en total 104 y 63 bacterias respectivamente. De las 104 bacterias aisladas en encenillo, 73 corresponden a microorganismos fijadores de nitrógeno y 31 a bacterias solubilizadoras de fósforo. En pagoda se recuperaron 11 cepas solubilizadoras y 52 posibles diazotróficas (Figura 1). La confirmación definitiva de las bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó mediante cromatografía de gases a 35 cepas de encenillo y 29 de pagoda.

La mayoría de bacterias aisladas en el ambiente rizosférico de pagoda correspondieron a bacterias Gram positivas (47 cepas), caso contrario de lo encontrado en el aislamiento realizado a la rizósfera de encenillo donde predominó la microbiota Gram-negativa (92 cepas) (Figura 1).

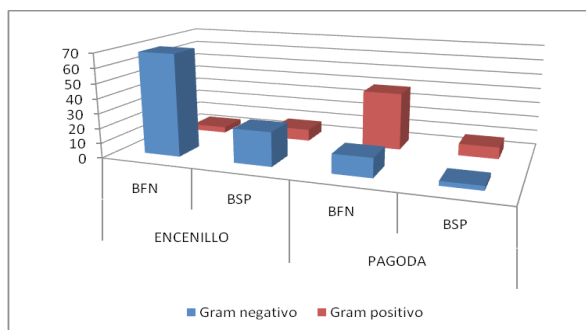


Figura 1. Número de cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas aisladas como diazotróficas y solubilizadoras de fosfato insoluble en Encenillo y Pagoda. BSP: Bacterias solubilizadoras de fósforo BFN: Bacterias fijadores de nitrógeno

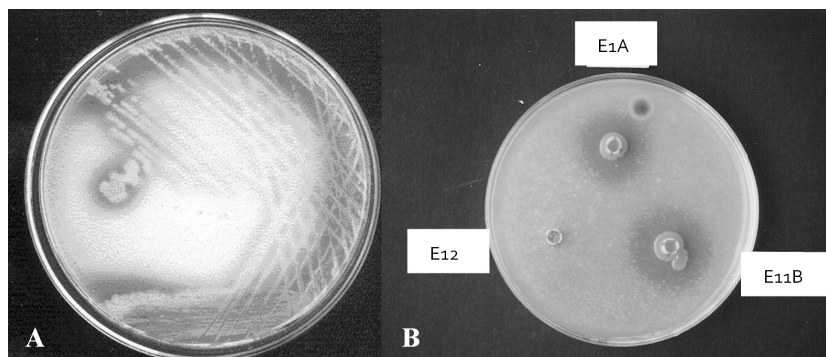


Figura 2. Disolución de fosfato insoluble por la cepa E11B aislada de encenillo en medio SRS (A) y en la prueba de anillos (B) comparando su actividad con E12 y E1A.

Solubilización de fósforo

Los radios de solubilización variaron entre 0-12 mm en encenillo y de 0-9 mm en pagoda. Las cepas que obtuvieron los cinco mejores resultados por especie forestal altoandina en la prueba semicuantitativa de disolución de fosfato, se muestran en la Tabla 2. Las colonias que presentaron los mayores halos fueron E11B (Figura 2) y E1A, las cuales corresponden a bacterias Gram-negativas en encenillo; mientras que en pagoda las mejores cepas fueron bacilos Gram-positivos (P5A.1 y P7B.2).

La solubilización de fósforo estuvo acompañada de acidificación del medio, detectada por el viraje de color del indicador de pH, azul de bromotimol en la mayoría de las cepas, sin relación directa entre el cambio de color y el halo de solubilización. Esto se presentó en la mayoría de cajas de petri con medio SRS donde hubo cambio de color en todo el medio independientemente del tamaño de halo de solubilización presentado por las diferentes cepas bacterianas.

Determinación de la capacidad diazotrófica *in vitro*

Las cepas analizadas de encenillo y pagoda exhibieron actividad del complejo enzimático nitrogenasa en mayor o menor grado. Los rangos de etileno variaron entre 1,2 a 2,02 nmol mL⁻¹ y 1,25 a 104,03 nmol mL⁻¹, respectivamente.

Las cinco cepas de encenillo que presentaron mejores resultados variaron su actividad en un rango de 1,8 y 2,02 nmol mL⁻¹; mientras que en pagoda, la cepa Gram-negativa P10A presentó una concentración importante (104,03 nmol mL⁻¹) comparada con los valores obtenidos por las demás bacterias (Tabla 3). Cabe destacar que la bacteria P5A.1, además de presentar la mayor capacidad de solubilización de fósforo, evidenció también actividad de la nitrogenasa (1,76 nmol mL⁻¹) al reducir el acetileno a etileno (Figura 3).

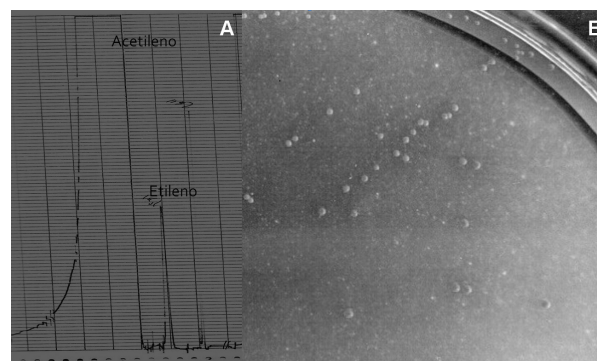


Figura 3. Actividades enzimáticas evaluadas *in vitro* en la cepa P5A.1. A. Cromatograma que muestra la producción de etileno por el complejo enzimático nitrogenasa. B. Solubilización de fosfato tricálcico alrededor de la colonia en medio sólido SRS.

Selección de microorganismos

Según el ensayo de reducción de acetileno y de disolución de fósforo, se escogieron y codificaron las cinco bacterias que exhibieron los valores más altos previa prueba de antagonismo (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Cepas que presentaron los mejores halos en la prueba semicuantitativa de disolución de fosfato

Especies forestales	Cepas	CÓDIGO	Radio (mm)
Encenillo	E11B	A	12
	E1A	B	11
	E2B.1	C	10
	E2A	D	9
	E6C.1	E	8.5
Pagoda	P5A.1	F	9
	P7B.2	G	8
	P12	H	7
	P5B	I	7
	P7.1	J	6

Tabla 3. Reducción de acetileno a etileno de las bacterias aisladas de encenillo y pagoda que presentaron los cinco mejores resultados.

Especie forestal	Cepa bacteriana	CÓDIGO	Concentración (nmol mL ⁻¹)
Encenillo	E14BA	1	2,02
	E12E	2	1,78
	E14C.2	3	1,78
	E13C	4	1,77
	E9C	5	1,77
Pagoda	P10A	6	104,03
	P15A	7	1,89
	P6.1D	8	1,85
	P6D	9	1,82
	P1E	10	1,80

Antagonismo

Ninguna de las veinte cepas presentó antagonismo por las dos técnicas evaluadas, lo cual permitió realizar diferentes mezclas para la evaluación *in vivo*.

Identificación de las cepas microbianas

Todas las cepas escogidas para la evaluación *in vivo* en encenillo correspondieron a bacterias Gram-negativas. Dentro de las bacterias diazotróficas se identificaron dos cepas cercanas al género fermentador *Enterobacter* y tres no fermentadoras cercanas a *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (Tabla 4). De las cinco cepas solubilizadoras de fósforo

Gram-negativas escogidas para el ensayo *in vivo*, se identificaron cepas cercanas a los géneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Brevudimonas* y *Burkholderia* (Tabla 4).

En pagoda todas las cepas escogidas como solubilizadoras de fósforo insoluble fueron Gram-positivas y se identificaron como cercanas a *Arthrobacter* sp., *Aeromicrobium* sp., *Corynebacterium* sp., *Pimelobacter* sp. y *Micrococcus* sp. Las bacterias fijadoras de nitrógeno fueron cercanas a los géneros *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Klebsiella* y *Flavobacterium* (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación preliminar de las bacterias escogidas de encenillo y pagoda por los paneles comerciales BBL cristal E/NF de Becton Dickinson y pruebas bioquímicas convencionales.

ESPECIE FORESTAL	BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO		BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO	
	CODIGO	IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA	CÓDIGO	IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA
ENCENILLO	1	<i>Enterobacter gergoviae</i>	A	<i>Pantoea</i> sp.
	2	<i>Alcaligenes</i> sp. (cepa E12E)	B	<i>Pantoea agglomerans</i>
	3	<i>Enterobacter</i> sp. (cepa E14C.2)	C	<i>Brevudimonas</i> sp.
	4	<i>Alcaligenes</i> sp. (cepa E13C)	D	<i>Burkholderia cepacia</i>
	5	<i>Pseudomonas</i> sp.	E	<i>Enterobacter</i> sp. (cepa E6C.1)
PAGODA	6	<i>Sphingomonas</i> sp.	F	<i>Arthrobacter</i> sp.
	7	<i>Paenibacillus</i> sp.	G	<i>Aeromicrobium</i> sp.
	8	<i>Achromobacter</i> sp.	H	<i>Corynebacterium</i> sp.
	9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I	<i>Pimelobacter</i> sp.
	10	<i>Flavobacterium odoratum</i>	J	<i>Micrococcus</i> sp.

Ensayo *in vivo* para evaluar el efecto inicial sobre el crecimiento longitudinal de las especies forestales encenillo y pagoda

En encenillo mediante la inoculación conjunta de la bacteria diazotrófica *E. gergoviae* y la solubilizadora de fósforo *Pantoea* sp. se obtuvo el mayor crecimiento de 8,0 cm (Tabla 5). El análisis estadístico ($P < 0,05$), mostró diferencias significativas entre tratamientos en donde las mezclas entre *E. gergoviae* con *Pantoea* sp., *Alcaligenes* sp. (Cepa E13C) más *P. agglomerans*, *E. gergoviae* y *P. agglomerans*, la mezcla de las 20 bacterias y el tratamiento con *Alcaligenes* sp. (Cepa E13C) más *Pantoea* sp., no mostraron diferencias entre sí, siendo los mejores tratamientos. Sin embargo, éstos presentaron diferencias significativas con la mezcla de las cuatro bacterias, medio estéril y suelo sin inocular (Tabla 5). Al comparar estos valores con los controles sin inoculación microbiana y con medio melaza, se obtuvo incrementos superiores a 51 y 57 % respectivamente (Figura 4).

El seguimiento a los individuos de pagoda mostró que el mejor promedio (18,6 cm) se obtuvo con la inoculación de las 20 bacterias (T6) (Figura 5). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre tratamientos, observando que las mezclas entre las 20 bacterias escogidas (T6), *Paenibacillus* sp. con *Arthrobacter* sp. (T3), tratamiento 4 (*Paenibacillus* sp. + *Arthrobacter* sp.), mezcla de las cuatro bacterias (T5) y *Sphingomonas* sp. con *Aeromicrobium* sp., no mostraron diferencias entre sí, correspondiendo a las de mejor resultado. Estos tratamientos presentaron diferencias significativas con la mezcla *Sphingomonas* sp. + *Arthrobacter* sp. (T1) y los controles, medio estéril y suelo sin inoculación bacteriana (Figura 5). Comparando los promedios de crecimiento del mejor tratamiento y el de los individuos de pagoda sin inocular y con adición de medio melaza estéril, se obtuvo un incremento superior en un 32 % y 16 % respectivamente con la mezcla bacteriana.

Tabla 5. Incremento promedio longitudinal de plántulas de encenillo a los tres meses de evaluación con bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo.

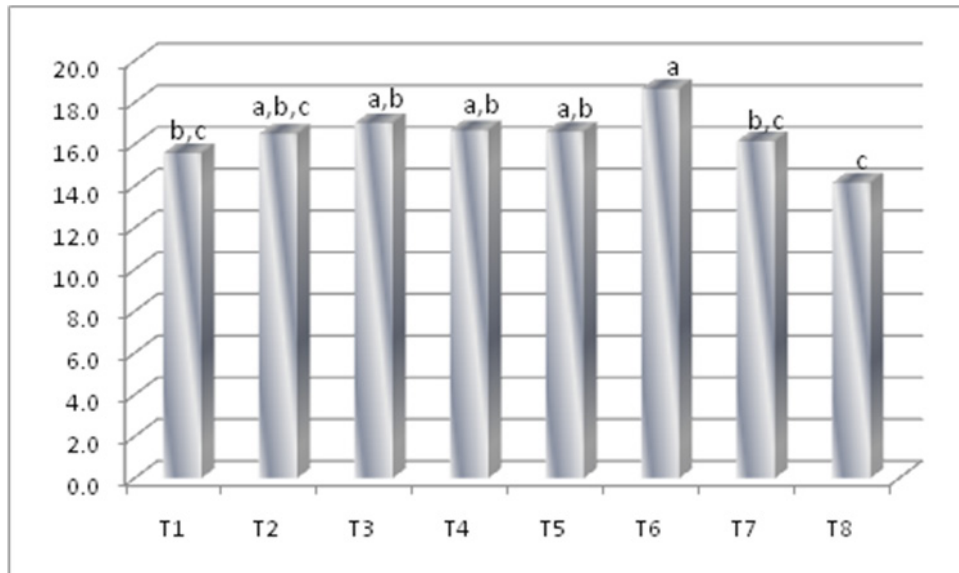
TRATAMIENTOS		PROMEDIO (cm)*
T1	<i>E. gergoviae</i> + <i>Pantoea</i> sp.	8,0 a
T2	<i>E. gergoviae</i> + <i>P. agglomerans</i>	6,5 a, b, c
T3	<i>Alcaligenes</i> sp. (cepa E13C) + <i>Pantoea</i> sp.	5,9 a, b, c
T4	<i>Alcaligenes</i> sp. (cepa E13C) + <i>P. agglomerans</i>	7,3 a, b
T5	<i>E. gergoviae</i> + <i>Alcaligenes</i> sp. (cepa E13C) + <i>Pantoea</i> sp. + <i>P. agglomerans</i>	4,3 c
T6	Mezcla de 20 bacterias escogidas	6,2 a, b, c
T7	Medio estéril	5,1 b, c
T8	Suelo sin inoculación	5,3 b, c

* P<0,05. Los datos representan los promedios de las tres réplicas. Las letras indican los niveles de la prueba de rango múltiple de Duncan, donde letras iguales indican promedios estadísticamente iguales. El primer nivel está representado por la letra a

Figura 4. Comparación del incremento longitudinal promedio entre la mezcla *E. gergoviae* + *Pantoea* sp., y los controles medio melaza estéril (CM) y suelo sin inoculación (SI) en individuos de encenillo.



Figura 5. Incremento longitudinal promedio en pagoda a los tres meses de evaluación con bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo. $P < 0,05$. Los datos representan los promedios de las tres replicas. Las letras indican los niveles de la prueba de rango múltiple de Duncan, donde letras iguales indican promedios estadísticamente iguales. El primer nivel está representado por la letra a.



DISCUSIÓN

Cultivo y aislamiento microbiano

Existen varias bacterias Gram-positivas reportadas como fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo; aunque hay predominio de bacterias Gram-negativas en la mayoría de ecosistemas forestales y cultivos agrícolas (Jiménez, 1996; Deaza y Mesa, 1996; Kumar et al., 1999; Vásquez et al., 2000; Baldini y Baldini, 2005; Barreto et al., 2007; Reinhardt et al., 2008). Sin embargo, en la micorizósfera de una conífera nativa de Noruega las bacterias Gram-positivas fueron predominantes (Karlifiski et al., 2007).

La recuperación de un número elevado de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos insolubles ha sido referenciada por diferentes investigadores en una gran variedad de especies forestales. Desde los años 70, se ha descrito que la fijación de nitrógeno se incrementa en la rizósfera y micorizósfera, comparado con el suelo no rizósferico, recuperando una mayor cantidad de microorganismos en estas zonas (Kikuchi y Ogawa, 1995; Jiménez, 1996; Paul et al., 2007; Neroni y Cardozo, 2007; Reed et al., 2008). Al igual que la microbiota

fijadora de nitrógeno, un mayor porcentaje de microorganismos que solubilizan fósforo se aíslan de la rizósfera de las plantas, jugando un papel muy importante en ecosistemas forestales ácidos o alcalinos, donde el fósforo se encuentra principalmente formando complejos insolubles que hacen que no sea disponible para las plantas (Kumar et al., 1999; Barreto et al., 2007; Pengnoo et al., 2007). La relevancia del aislamiento de una gran variedad de bacterias con actividad diazotrófica y de disolución de fosfatos insolubles en encenillo y pagoda, radica en el hecho que los suelos donde crecen estas especies forestales son extremadamente ácidos (pH 4,2), y se caracterizan por presentar deficiencias de fósforo, disminución de la fijación de nitrógeno y nitrificación (Rodríguez y Urrego, 2003).

Solubilización de fósforo

Los microorganismos solubilizadores de fosfato juegan un papel primordial en muchos ecosistemas forestales; principalmente en los que por su origen, características químicas o degradación, presentan baja fertilidad, principalmente de fósforo y nitrógeno disponible (Fankem et al., 2006; Barreto et al., 2007). Si

tenemos en cuenta que los suelos donde crecen las especies forestales estudiadas presentan estas características (Rodríguez y Urrego, 2003), el hallazgo de un 30 % y 17 % de bacterias con actividad enzimática para disolver fósforo insoluble en encenillo y pagoda respectivamente, posiblemente indican que desempeñan un papel importante en su nutrición, al proveer el fósforo limitante en el sistema.

Por otro lado la presencia de halos de acidez alrededor del anillo de plástico se debe a la producción de ácidos orgánicos que solubilizan el fósforo; sin embargo, es importante aclarar que muchos microorganismos aunque no presenten halos claros alrededor del anillo, pueden disolver elevadas concentraciones de fósforo, debido a que la producción de ácido no es la única explicación en la solubilización de fosfatos inorgánicos insolubles (Gyaneshwar et al., 1999; Rodríguez y Urrego, 2003; Khan et al., 2009).

Determinación de la capacidad diazotrófica *in vitro*

En suelos cercanos a la neutralidad predominan la fijación de nitrógeno y la nitrificación (Rodríguez y Urrego, 2003). Sin embargo, el 51 % de las cepas que crecieron en medio libre de nitrógeno y que se les realizó el ensayo de reducción de acetileno, produjeron en mayor o menor grado etileno; confirmando la presencia del complejo enzimático nitrogenasa (Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009). En suelos forestales donde se presenta deficiencia de nitrógeno se ha comprobado el papel de los microorganismos diazotróficos en la rehabilitación y sustentabilidad de los ecosistemas al incorporar nitrógeno y producir sustancias estimuladoras de crecimiento vegetal (Rösch et al., 2002; Neroni y Cardozo, 2007; Paul et al., 2007; Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009; Elliot et al., 2009).

Identificación de las cepas microbianas escogidas

La mayoría de géneros identificados en esta investigación como fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo han sido aislados en diferentes ecosistemas forestales, agroforestales o cultivos agrícolas (Gyaneshwar et al., 1999;

Rösch et al., 2002; Suliasih y Widawati, 2005; Tilak et al., 2005; Fanken et al., 2006; Xie y Yokota, 2006; Zhang et al., 2006; Shrestha et al., 2007; Kämpfer, 2007; Neroni y Cardozo, 2007; Paul et al., 2007; Pengnoo et al., 2007; Reinhardt et al., 2008; Bergmann et al., 2009; Elliott et al., 2009; Khan et al., 2009; Zhao et al., 2009).

En Colombia se han aislado bacterias diazotróficas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azopirillum*, de Bosque Altoandino cundinamarqués y de especies forestales como cedro rosado (*Cedrela Montana* Turczaninow), pino romeron (*Nageia rospigliosii* Pilger Laubenfels) y pino pátula (*Pinus patula* Schlecht et Cham) (Deaza y Mesa, 1996; Jiménez, 1996; Parra, 1996; Urrego-Layton et al., 2006; Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto, 2009). Con relación a bacterias solubilizadoras de fosfatos encontradas en ecosistemas forestales en nuestro país se han aislados géneros cercanos a *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* de Bosque Altoandino y de la especie arbórea de Bosque Seco Tropical, caracolí (*Anacardium excelsum* Kunth) (Rodríguez y Urrego, 2003; Barreto et al., 2007).

Ensayo *in vivo* para evaluar el efecto inicial sobre el crecimiento longitudinal de las especies forestales encenillo y pagoda

Al igual que en la presente investigación, estudios realizados tanto a nivel agrícola como forestal, obtuvieron mejores resultados utilizando mezclas bacterianas en la estimulación de diferentes parámetros vegetales, incluyendo el crecimiento longitudinal (Belimov et al., 1995; Bohórquez, 1999; Rodin et al., 1997; Rodríguez y Urrego, 2003; Medina et al., 2008; Khan et al., 2009; Rawia et al., 2009). Caso contrario a lo encontrado en investigaciones como las de Parra (1996), Barreto et al. (2007) y Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto (2009), donde los mejores resultados se observaron con inoculaciones separadas de bacterias fijadoras de nitrógeno o solubilizadoras de fosfato.

Los consorcios microbianos en muchos casos interactúan de manera sinérgica suministrando

nutrientes, produciendo sustancias estimuladoras de crecimiento vegetal, controlando patógenos, removiendo productos inhibitorios del metabolismo o estimulando algunas actividades físicas o bioquímicas de las bacterias involucradas en las mezclas que producen efectos benéficos sobre las plantas (Bashan y De Bashan, 2005; Peña y Reyes, 2007).

CONCLUSIÓN

La mayoría de mezclas de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo actuaron de manera sinérgica, estimulando significativamente el crecimiento longitudinal comparado con los controles con medio melaza estéril y sin inoculación bacteriana; indicando el potencial de estos microorganismos como promotores de crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Autónoma de Cundinamarca CAR, por la financiación de la investigación al igual que a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA-TIBAITATÁ, laboratorio de Recursos Biofísicos por prestar sus instalaciones y técnicos para la realización de la prueba de reducción de acetileno.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, J.C., C. Barbosa, S. Cruz, S.P. Ramírez, F. Salazar, J. Ville y A. Villa. 2002. Transformaciones de las coberturas vegetales en los Páramos de Colombia: un punto de partida para la evaluación ambiental. En: Castaño-Urbe, C. (Ed). Páramos y Ecosistemas Alto Andinos de Colombia en Condiciones Hot Spot & Global Climatic Tensor. Bogotá, Colombia: 211- 222.

Baldani, J.I. y V.L.D. Baldani. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Bras. Ciênc. 77 (3): 549-57.

Barreto, D., N. Valero, A. Muñoz y A. Peralta. 2007. Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. Zonas Áridas 11 (1): 240-250

Bartholomaeus, A., A. de La Rosa, J. Santos, L. Acero y W. Moosbrugger. 1990. El manto de la tierra. Flora de los Andes. Guía de 150 especies de la Flora Andina. Ediciones Lerner LTDA, Bogotá, 332 p.

Bashan, Y. y L.E. De Bashan. 2005. Plant Growth-Promoting. En: Hillel, D. (Ed). Encyclopedia of soils in environmental. Elsevier, Oxford: 103-115.

Belimov, A., A. Kojemiakov, C. Chubarliyeva. 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. Plant Soil 173: 29-37.

Bergmann, D., M. Zehfus., L. Zierer., B. Smith, y M. Gabel 2009. Grass Rhizospheres: Associated Bacterial Communities and Potential for Nitrogen Fixation. Western North American Naturalist 69(1): 105-114. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.3398/064.069.0102>

Bohórquez, W. 1999. Efecto de un biofertilizante de *Azotobacter chroococcum* y bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) en un cultivo de tomillo (*Thimus vulgaris* L). Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 107 p.

Brenner, D.J., N.R. Krieg, G.M. Garrity y J.T. Staley. 2005. The Proteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume II. Michigan, USA, 1388 p

CAR. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. 2009. Términos de referencia para restaurar áreas protegidas en la jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. Disponible en: http://www.car.gov.co/documentos/4_19_2010_11_53_19_AM_TDR%20Restauraci%C3%B3n%20Areas%20Prote.pdf

Carreira, J.A., R. García-Ruiz, B. Viñeola, V. Ochoa y M.B. Hinojosa. 2008. La restauración y seguimiento de procesos biogeoquímicos esenciales relacionados con el reciclado de nutrientes en los suelos de Guadimar. En: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. (Ed). Dirección General de la red de espacios naturales protegidos y servicios ambientales. Sevilla, España: 165-190.

Carrillo, A., E. Puente., T. Castellanos y Y. Bashan. 1998. Aplicaciones biotecnológicas de Ecología Microbiana. Manual de Laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana y Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Bogotá, 51 p.

Chanway, C.P., M. Shishido, J. Nairn, S. Jungwirth, J. Markham, G. Xiao F.B. Holl 2000. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. Forest Ecol.Manag. 133 (1-2): 81-88.

DAMA. Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente. 2000. Protocolo Distrital de restauración ecológica. Guía para la restauración de ecosistemas nativos en las áreas rurales de Santafé de Bogotá. DAMA, Bogotá, 288 p.

Deaza, J. y C. Mesa. 1996. Aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas asociadas a rizósfera de *Nageia rospigliosii* (Pilger Laubenfels). Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 89 p.

Elliott, G.N., C. Jui-Hsing, C. Wen-Ming, G.V. Bloemberg, C. Bontemps, E. Martínez-Romero, E. Velázquez, J. Peter, W. Young, J.I. Sprent y E.K. James. 2009. *Burkholderia* spp. is the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. Environ. Microbiol. 11 (4): 762-778.

Fankem, H., D. Nwaga, A. Deubel, L. Dieng, W. Merbach y X.F. Etoa. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rizosphere in Cameroon. Afr. J. Biotechnol. 5 (24): 2450-2460.

Gomes, N.C.M., D.F.R. Cleary, F.N. Pinto, C. Egas y A. Almeida. 2010. Taking Root: Enduring Effect of Rhizosphere Bacterial Colonization in Mangroves. Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0014065>

- Gómez-Sánchez, C. 2009. Cambio climático y degradación de suelos del páramo colombiano. Disponible en: <http://www.lablaa.org/blaavirtual/geografia/congresoparamo/cambios-transformaciones.pdf>
- Gyaneshwar, P., L. J. Parekh, G. Shrestha, P.S. Poole, M.D. Collins, R.A. Hutson y G.N. Kumar. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. FEMS Microbiol. Lett. 171 (2): 223-229.
- ICONTEC. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2004. Guía sobre el procedimiento para la investigación de sitios naturales, seminaturales y cultivados. Calidad del suelo muestreo. Bogotá, 18 p.
- Jiménez, A. 1996. Aislamiento y caracterización de diazotróficos microaerófilos presentes en suelos rizósferico y raíces de *Cedrela montana*. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 113 p.
- Kämpfer, P. 2007. Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. En: Velázquez, E. y C. Rodríguez-Barrueco. (Eds). Developments in Plant and Soil Sciences. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer, Holanda: 101-106. Disponible en: <http://www.sp.springerlink.com/content/1107158426521746/>
- Karlifiski, L., S. Ravnskov, B. Kieliszewska-Rokicka y J. Larsen. 2007. Fatty acid composition of various ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas of Norway spruce. Soil Biol. Biochem. 39(4): 854-866.
- Khan, A.A., G. Jilani, M.S. Akhtar, S.M.S. Maqvi y M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanics and their role in crop production. J. Agric. Biol. Sci. 1 (1): 48-58.
- Kikuchi, J. y M. Ogawa. 1995. Nitrogen-Fixing (acetylene reducing) activity in the mycorrhizas of dipterocarp seedling. Disponible en: <http://www.metla.fi/iufro/iufro95abs/d7pap6.htm>
- Mantilla-Paredes, J., G. Cardona, C.P. Peña-Venegas, U. Murcia, M. Rodríguez y M.M. Zambrano. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros físicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Rev. Biol. Trop. 57: 915-927.
- Kumar, J., S. Sanjay y C. Shekhar. 1999. Occurrence of salt, pH and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. Curr. Microbiol. 39: 89-93.
- Martínez, M.M., P. Martínez, M. Franco y M. Cárdenas. 2003. Manual de Laboratorio: Microbiología Ambiental. Centro Editorial Javeriano, Bogotá, 184 p.
- Martínez-Nieto, P. 2002. Problemática de los cultivos ilícitos en los ecosistemas de Alta Montaña. En: Castaño-Urbe, C. (Ed). Páramos y Ecosistemas Alto Andinos de Colombia en Condiciones Hot Spot & Global Climatic Tensor. Bogotá, Colombia: 295-305.
- MAVDT. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 2003. Restauración de Ecosistemas a partir del manejo de la vegetación. Guía metodológica. Grupo de Ecosistemas Forestales, Bogotá, 98 p. Disponible en: <http://ibcperu.org/doc/isis/7413.pdf>
- Medina, S. M., H. Orozco y M.C. Díez. 2008. Establecimiento de un sistema silvopastoril mediante las especies *Alnus acuminata* H.B.K. y *Acacia decurrens* Willd y respuesta al empleo de organismos rizosféricos en San Pedro (Antioquia). Livestock Research for Rural Development. Volume 20, Article #7. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd20/1/medi20007.htm>
- Mikanoka, O. y J. Novakova. 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganism and its sensitivity to soluble phosphate. Rost. Vyroba. 48 (9): 397-400.
- Montenegro, A.B y O. Vargas. 2008. Atributos vitales de especies leñosas en bordes de Bosque Altoandino de la Reserva Forestal de Cogua (Colombia). Rev. Biol. Trop. 56 (2): 705-720.
- Morales, M., J. Otero, T. Van Der Hammen, A. Torres, C. Cadena, C. Pedraza, N. Rodríguez, C. Franco, J.C. Betancourt, E. Olaya, E. Posada y L. Cárdenas. 2007. Atlas de Páramos de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, 208p.
- Muthukumar, T., K. Udaiyan y V. Rajeshkannan. 2001. Response neem (*Azadirachta indica* A. Juss) to indigenous arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing, and asymbiotic nitrogen-fixing bacteria under tropical nursery conditions. Biol. Fertil. Soils. 34: 417-426.
- Neroni, R. y E. Cardozo. 2007. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. Sci. Agri. 64(3): 303-304.
- Orozco-Jaramillo, C. y P. Martínez-Nieto. 2009. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. Bosque 30 (2): 70-77.
- Ortiz, L.H. y M.A. Reyes. 2009. Páramos en Colombia un ecosistema vulnerable. Observatorio Medio Ambiental. Grupo de Estudios en Economía Política y Medio Ambiente. Universidad Sergio Arboleda, Bogotá. Disponible en http://www.usergioarboleda.edu.co/observatorio_economico/Observatorio%20Ambiental/paramos-colombia.pdf
- Parra, C. 1996. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo inicial de *Cedrela montana* Turczaninow (Cedro rosado). Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 124 p.
- Paul, L. R., B. K. Chapman y C. P. Chanway. 2007. Nitrogen fixation associated with *Suillus tomentosus* tuberculate ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. latifolia. Ann. Bot. 99 (6): 1101-1109.
- Pengnoo, A., Y. Hashidoko, J. Onthong, S. Gimsanguan, M. Sae-ong, T. Shinano, T. Watanabe y M. Osaki. 2007. Screening of the phosphate-solubilizing microorganisms in rhizosphere and rhizoplane of adverse soil-adapting plant in Southern Thailand. Tropics. 16 (1): 1-7.
- Peña, H.B. y I. Reyes. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L). Interciencia 32 (8): 560-565.
- Rawia, A., A. Nemat y H.A. Hamouda. 2009. Evaluate effectiveness of bio and mineral fertilization on the growth parameters and marketable cut flowers of *Mattiola incana* L. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 5 (4): 509-518.
- Reed, S. C., C. C. Cleveland y A. R. Townsend. 2008. Trees species control rates of free living nitrogen fixation in a tropical rain forest. Ecology 89 (10): 2924-2934.
- Reinhardt, É.L., P.L. Ramos, G.P. Manfio, H.R. Barbosa, C. Pavan y C.A. Moreira-Filho. 2008. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from brazilian agricultural plants at São Paulo state. Braz. J. Microbiol. 39 (3): 414-422.
- Rodin, A.R., N. Popova y E.V. Kandyba. 1997. Highly effective biological preparations for forest nurseries. Lesnoe Khozyaistvo 1: 28-30.
- Rodríguez, D. X. y L.J. Urrego. 2003. Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotróficas y solubilización de fósforo aisladas de bosque alto andino cundinamarqués. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 147 p.
- Rösch, C., A. Mergel y H. Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. Appl. Environ. Microbiol. 68 (8): 3818-3829.

Shrestha, A., K. Toyota, M. Okazaki, Y. Suga, M.A. Quevedo, A.B. Loreto y A.A. Mariscal. 2007. Enhancement of nitrogen-fixing activity of *Enterobacteriaceae* strains isolated from sago palm (*Metroxylon sagu*) by microbial interaction with non-nitrogen fixers. *Microbes Environ.* 22 (1): 59-70.

Suliasih y S. Widawati. 2005. Isolation and Identification of phosphate solubilizing and nitrogen fixing bacteria from soil in Wamena biological garden, Jayawijaya, Papua. *Biodiversitas* 6 (5): 175-177. Disponible en: <http://www.unsjournals.com/D/D0603/D0603pdf/D060307.pdf>

Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C. Shekhar-Nautiyal, S. Mittal, A. K. Tripathi y B. N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soils health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89 (1): 136-150.

Urrego-Layton, J., D. Rodríguez-Aponte, J. Bernal-Castillo y P. Martínez-Nieto. 2006. Inmovilización de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de un Bosque Alto Andino Cundinamarqués. En: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Ed). I Congreso Nacional en Sistemas de Alta Montaña Tropical. Memorias en formato digital.

Vásquez, P., G. Holguín, M.E. Puente, A. López-Cortes y Y. Bashan. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* 30: 460-468.

Xie, C.H. y A. Yokota. 2006. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oriza sativa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 889-893.

Zhang, Y., L. Diqiang, W. Huimin, X. Qiming y L. Xueduan. 2006. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China. *FEMS Microbiol. Lett.* 260 (2): 134-142.

Zhao, X., C.H. Javed, Y. He, Z. Zhang, G. Peng y Z. Tan. 2009. Diversity of associated nitrogen-fixing bacteria isolated from the pioneer plants-Vetiver zizanioides. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 49(11):1430-1437. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112669>

Fecha de recepción: 28/02/2010
Fecha de aceptación: 06/05/2010

.000.