

**Bioprospección de microorganismos
diazótrofos como una alternativa
para el mejoramiento del suelo en el
canopy urbano de la
Universidad EAN**

*Bioprospection of diazotrophic
microorganisms as an alternative
for soil improvement in the urban
canopy of EAN University*

*Bio-prospection de micro-organismes
diazotrophes comme alternative
pour l'amélioration du sol de la
Canopée Urbaine de l'Université EAN*

*Bioprospeção de microrganismos
diazotróficos como uma alternativa
para melhorar o solo no canopy
urbano da Universidade EAN*

Paola Andrea Bautista Duarte*

Fecha de recepción: 9 de febrero

Fecha de aprobación: 8 de marzo

Pp. 67-88

* Magíster en Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes; microbióloga de la Universidad de los Andes. Docente catedrático, programa de Ingeniería Ambiental de la Universidad EAN.

RESUMEN

Para el Canopy Urbano de la Universidad EAN, aprovechado para el seguimiento de polinizados y cultivo de plantas, se realizó la bioprospección de microorganismos del ciclo de nitrógeno en cinco muestras de suelo. Se seleccionaron 15 morfotipos aerobios mesófilos, de los cuales seis son fijadores de nitrógeno y no producen lesiones en hojas de *Lactuca sativa*, usado como modelo biológico para evidenciar posibles patógenos para plantas. El aislamiento de diazotrofos en el Canopy Urbano demuestra su potencialidad de aprovechamiento como la formulación a futuro de biofertilizantes que sean aplicados, tanto en la Universidad EAN como en otros techos verdes.

PALABRAS CLAVE

Diazotrófos, techos verdes, bioprospección, biofertilizantes.

ABSTRACT

*For the urban canopy of the EAN University, harnessed to monitor pollinated and growing plants, a bioprospection of the nitrogen cycle microorganisms in five soil samples was conducted. Fifteen mesophilic aerobic morphotypes were selected, from which six are nitrogen fixers and do not produce any lesions on the *Lactuca sativa* leaves, used as a biological model to show potential pathogens for plants. Diazotrophs isolation in urban canopy demonstrates its potential utilization as the future formulation of bio-fertilizers that could be applied in both, the EAN University and other green roofs.*

KEYWORDS

Diazotrophs, green roofs, bioprospection, bio-fertilizers.

RÉSUMÉ

*La Canopée Urbaine de l'Université EAN est mise à profit pour le suivi de pollinisateurs et la culture de plantes mais aussi pour la réalisation de bio-prospection de micro-organismes participant au cycle de l'azote dans cinq échantillons de sol. Sur les quinze morphotypes d'aérobies mésophiles qui ont été sélectionnés, six sont fixateurs d'azote et ne produisent pas de lésions aux feuilles de *Lactuca sativa*, plante utilisée comme modèle biologique pour mettre en évidence de possibles agents végétaux pathogènes. L'isolement de diazotrophes au sein de la Canopée Urbaine révèle une potentielle profitabilité via la création future de bio-engrais appliqués aux toits végétaux urbains.*

MOTS CLEFS

Diazotrophes, végétaux urbains, bio-prospection, bio-engrais.

RESUMO

*Aproveitado para monitorar as plantas polinizadas e cultivadas no canopy urbano da Universidade EAN, se realizou em cinco amostras de solo a bioprospecção de microrganismos do ciclo de nitrogênio. Foram selecionados 15 morfótipos mesófilos aeróbios, dos quais seis são fixadores de nitrogênio e não produzem lesões nas folhas de *Lactuca sativa*, usadas como modelo biológico para evidenciar possíveis patógenos para as plantas. O isolamento de diazotróficas no Canopy Urbano demonstra seu potencial aproveitamento a formulação a futuro de bio-fertilizantes que sejam aplicados tanto na Universidade EAN como em outros telhados verdes.*

PALAVRAS-CHAVE

Diazotróficas, telhados verdes, bioprospecção, bio-fertilizantes.

1. Introducción

En las últimas décadas se ha tomado conciencia acerca del agotamiento de los recursos naturales debido a la explotación desmesurada de los mismos. En el ámbito agrícola, el objetivo es lograr altos rendimientos por unidad de superficie para satisfacer la demanda actual de alimentos sin considerar la sostenibilidad de la producción (Grageda-Cabrera, 2012). Lo anterior trajo como consecuencia daños ambientales por el exceso de fertilizantes, plaguicidas y sobre uso de la tierra que afectan tanto la calidad de los productos como a los agricultores a nivel económico.

Sin embargo, la necesidad de entrar en una agricultura sostenible que contribuya a unos procesos más sanos ha enfocado la visión de los investigadores sobre cómo los usos del suelo han afectado a sus comunidades microbianas, el rol en los ciclos biogeoquímicos y cómo el aprovechar sus cualidades para beneficio de las plantas se convierte en una herramienta que permite minimizar el uso de sustancias químicas sobre los cultivos en la actualidad (Bannert et al., 2011; Lopez, et al., 2008).

Uno de los requerimientos nutricionales más importantes para el mantenimiento del suelo es el nitrógeno, el cual, para corregir su deficiencia, se le adiciona fertilizantes de tipo inorgánico; así, se estima que la planta solo absorbe del 20% al 40% del fertilizante que se aplica y el resto se pierde generando problemas de contaminación y pérdidas económicas (Grageda-Cabrera, 2012; Armenta-Bojorquez, et al., 2010) Es así que, los biofertilizantes se convierten en una de las tecnologías más promisorias que permite incrementar la productividad del suelo con un bajo impacto ambiental (López et al., 2008)

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos que se aplican al suelo y planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética, así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos (Armenta-Bojorquez et al., 2010); el uso de los microorganismos se considera como un elemento importante en la agricultura mediante el entendimiento de su actividad en las propiedades del suelo y en la planta misma. Para la planta, entre los beneficios que pueden aportar los microorganismos, se encuentran la descomposición de materia orgánica, la desintoxicación de plaguicidas, estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal, procesos de asociación de vida libre o simbiótica para el suministro de nutrientes tanto a la planta como al suelo, producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas, la protección contra patógenos y el suministro de nitrógeno (Terry et al., 2005; Alarcón y Ferrera, 2000).

El nitrógeno es un constituyente esencial de las moléculas fundamentales de los seres vivos tales como los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. Se encuentra en la atmósfera disponible de manera gaseosa, representa cerca del 78% de los gases presentes, prácticamente su reserva es ilimitada y no es usada directamente por los vegetales ni los animales (Mantilla-Paredes et al., 2009; Zhang et al., 2004; Baca et al., 2000).

La fijación biológica de nitrógeno es una función exclusiva de procariotas los cuales se denominan como organismos diazotrofos (Wilson et al., 2015; Baca et al., 2000); pueden actuar de manera libre o realizando simbiosis con las plantas. La fijación de nitrógeno se da por la reducción enzimática de N_2 a NH_3^+ por acción de la enzima nitrogenasa, que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa; los diazotrofos son los responsables de producir nitrógeno biodisponible en forma de amonio y

también producir biomasa bacteriana (Acuña et al., 2010). Por tanto, la búsqueda de este grupo de microorganismos juegan un rol fundamental en la agricultura sostenible si se pretende evitar el uso de fertilizantes inorgánicos para el aprovechamiento de los recursos; de esta forma se pretende establecer la presencia de microorganismos pertenecientes al ciclo del nitrógeno en el techo verde de la Universidad EAN con miras a ser utilizados a futuro en la formulación de biofertilizantes.

2. Metodología

Para la detección de fijadores de nitrógeno se tomó una muestra de 100g cercanos al área radicular sin afectar la planta en cinco puntos diferentes en el Canopy Urbano de la Universidad EAN, las cuales fueron sembradas en Agar Nutritivo de Oxoid para determinar la morfología macroscópica predominante en las muestras.

Posteriormente a la selección de los morfotipos macroscópicos dominantes en las muestras de suelo, se realizaron pases a medio de cultivo selectivo para el aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno en el agar Ashby: CaCl_2 (0,2g/l), Sacarosa (20g/l), KH_2PO_4 (1,0 g/l), MgSO_4 (0,2g/l), FeSO_4 (0,005 g/l), NaCl (0,2 g/l), Agar base (15g/l), o también puede prepararse el medio reportado por Hashidoko y colaboradores en 2002 con la composición de CaCO_3 (0,1g/l), Glucosa (10g/l), Agar base (15g/l), 5ml de solución de sales (KH_2PO_4 (50g/l), $\text{Mg}\cdot\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25g/l), NaCl (25g/l), $\text{FeSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1g/l), $\text{NaMoO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1g/l), $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1g/l)). El aislamiento, utilizando medios diferenciales, permite realizar una descripción

macroscópica y microscópica de los microorganismos y por repiques sucesivos se seleccionan aquellos morfotipos que fijan el nitrógeno de forma atmosférica.

Una vez que se estableció que los morfotipos fijan nitrógeno, fue necesario realizar pruebas de patogenicidad pues si se espera utilizarlos a futuro como posible biofertilizante es importante establecer que no causen efectos negativos sobre las plantas. Para realizar la prueba se siguió el procedimiento descrito por Vives y Garnica (2006) que consiste en utilizar hojas internas de lechuga las cuales son desinfectadas en hipoclorito de sodio al 0,5% por un tiempo de tres minutos, seguido de un baño de alcohol al 70% por 30 segundos y luego bañadas en agua estéril; cortes de 2 cm de diámetro de las hojas de lechuga se inoculan con los microorganismos seleccionados y luego de un periodo de incubación de 24h a 35°C se descartan aquellos que producen lesión a la hoja de lechuga.

Los microorganismos seleccionados fueron preservados adecuadamente para iniciar la colección de microorganismos de la Universidad EAN y ser evaluados en estudios posteriores.

3. Resultados y discusión

En cinco puntos del canopy urbano de la Universidad EAN, se tomaron muestras de suelo al azar con un peso aproximado de 100 gramos, posteriormente, se llevaron al laboratorio de ciencias básicas y fueron sembrados en medio de Agar Nutritivo para establecer la presencia de microorganismos aerobios mesófilos. A continuación se presentan los resultados de los recuentos (Tabla 1).

Tabla 1. Recuento de aerobios mesófilos en muestras de suelo del canopy urbano

Lugar de muestreo	UFC/g
Plantas ornamentales costado occidental	60x10 ⁵
Plantas ornamentales costado oriental	41x10 ⁶
Cultivos uchuvas	34x10 ⁴
Cultivos fresas	18x10 ⁵
Cultivos lechugas	39x10 ⁴

Fuente. Elaboración propia de los autores.

Luego de la bioprospección inicial se estableció que de los cinco lugares elegidos para hacer el monitoreo, el suelo de las plantas ornamentales ubicado en el costado oriental del canopy urbano, presenta la mayor actividad de microorganismos aerobios mesófilos seguidos del suelo del costado occidental de las plantas ornamentales, y posteriormente, los cultivos de frutas y hortalizas. Esto puede darse al constante mantenimiento que se les debe dar a las plantas ornamentales.

Por otro lado, los morfotipos más predominantes corresponden a colonias blancas, textura cerosa, seguidas de morfologías rizoides y, en algunos casos, colonias pequeñas amarillas, rosadas o blancas. Se presenta la descripción macroscópica y microscópica de los morfotipos seleccionados en cada una de las muestras de suelo (Tabla 2).

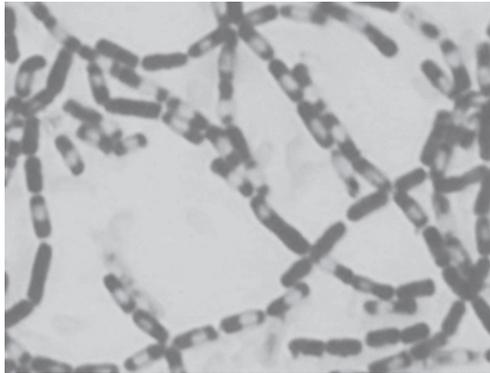
Tabla 2. Descripción macroscópica y microscópica de los morfotipos seleccionados

Morfotipo	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
EAN 1.1	Blanca, plano, ceroso, borde irregular	Bacilo gram +
EAN 1.2	Crema, redonda, elevada, cremosa, pequeña	Bacilo gram -
EAN 1.3	Amarillo claro, fusiforme, planas, enteras, brillantes	Cocos gram +
EAN 2.1	Blanca, ceroso, redonda, plana, regular, circular	Bacilo gram +
EAN 2.2	Amarilla, pequeña, brillante, elevada, pequeña	Cocos gram +
EAN 2.3	Crema, redonda, irregular, plana, grande	Bacilo gram +
EAN 3.1	Crema, fusiforme, elevada, brillante	Bacilo gram -
EAN 3.2	Crema, puntiforme, plana, entera, pequeña	Bacilo gram -
EAN 3.3	Rosada, circular, pequeña, elevada, brillante	Cocos gram +
EAN 4.1	Blanca, cerosa, opaca, rizoide	Bacilos gram +
EAN 4.2	Amarilla, pequeña, redonda, elevada	Cocos gram +
EAN 4.3	Blanca, granular, plana, brillante	Bacilos gram -
EAN 5.1	Cremosa, puntiforme, elevada, pequeña	Bacilo gram -
EAN 5.2	Blanca, cerosa, irregular, grande	Bacilo gram +
EAN 5.3	Blanca cerosa, regular, grande	Bacilo gram +

Fuente. Elaboración propia de los autores.

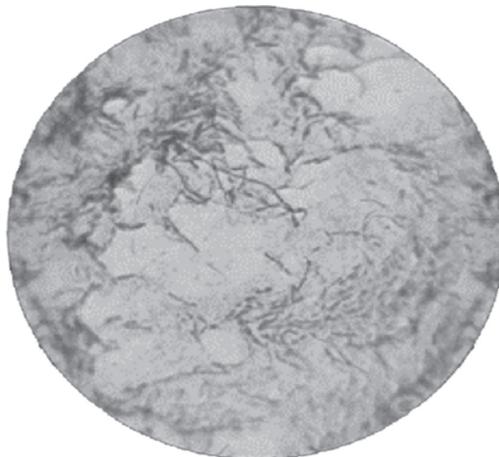
La mayoría de los morfotipos que fueron seleccionados corresponden a la morfología microscópica de Bacilos, y el 66,6% corresponden a gram positivos; esto pertenece a microorganismos con pared de peptidoglicano más gruesa que retiene el colorante violeta; de las bacterias descritas los morfotipos EAN 2.1, 4.1, 5.2, y 5.3 son bacilos gram positivos con espora central no deformante (Figura 1; Figura 2; Figura 3; Figura 4).

Figura 1. Bacilo gram positivo esporulado (morfotipo EAN 5.2)



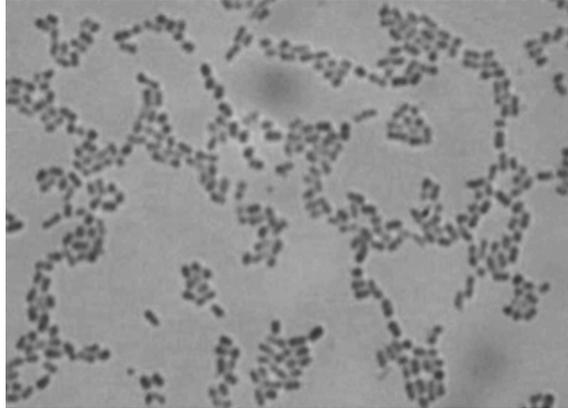
Fuente. Elaboración propia de los autores.

Figura 2. Bacilo gram positivo no esporulado (morfotipo EAN 1.1)



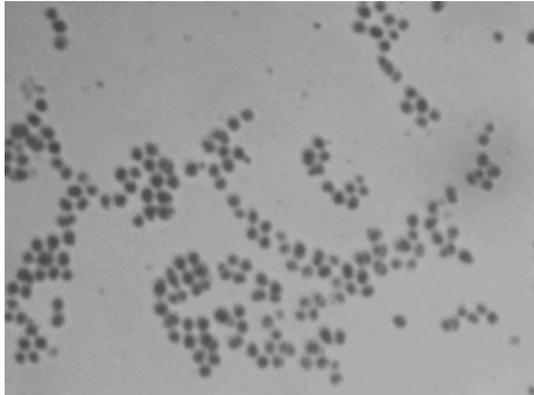
Fuente. Elaboración propia de los autores.

Figura 3. Bacilo corto gram negativo (morfotipo EAN 3.1)



Fuente. Elaboración propia de los autores.

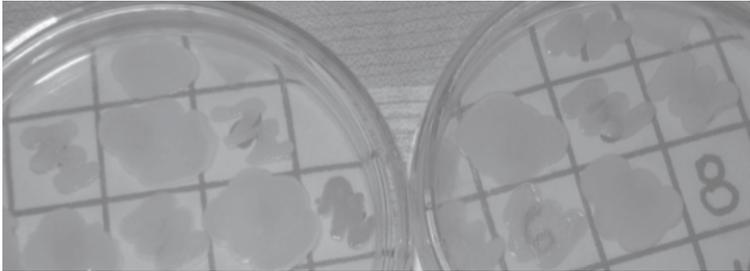
Figura 4. Cocos gram positivos (morfotipos EAN 4.2)



Fuente. Elaboración propia de los autores.

Posterior a la selección de los 15 morfotipos más abundantes (Tabla 2), se procedió a sembrarlos en el medio libre de nitrógeno (Hashidoko et al., 2002) anteriormente descrito. El método de siembra fue replica plating para agotar su fuente de nitrógeno y obligar a los microorganismos a fijarlo atmosféricamente.

Figura 5. Siembra en réplica plating de los 15 morfotipos seleccionados



Fuente. Elaboración propia de los autores.

De los 15 morfotipos seleccionados solamente 10 de ellos, luego de cuatro pases sucesivos, fueron capaces de crecer en medio libre de nitrógeno, por tanto, se les puede considerar como diazotrofos. A continuación se menciona los microorganismos fijadores de nitrógeno (Tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos fijadores de nitrógeno

Morfotipo	Descripción macroscópica	Descripción microscópica	Fijador de nitrógeno
EAN 1.1	Blanca, plano, ceroso, borde irregular	Bacilo gram +	Negativo
EAN 1.2	Crema, redonda, elevada, cremosa, pequeña	Bacilo gram -	Positivo
EAN 1.3	Amarillo claro, fusiforme, planas, enteras, brillantes	Cocos gram +	Positivo
EAN 2.1	Blanca, ceroso, redonda, plana, regular, circular	Bacilo gram +	Negativo
EAN 2.2	Amarilla, pequeña, brillante, elevada, pequeña	Cocos gram +	Positivo
EAN 2.3	Crema, redonda, irregular, plana, grande	Bacilo gram +	Positivo
EAN 3.1	Crema, fusiforme, elevada, brillante	Bacilo gram -	Positivo
EAN 3.2	Crema, puntiforme, plana, entera, pequeña	Bacilo gram -	Positivo

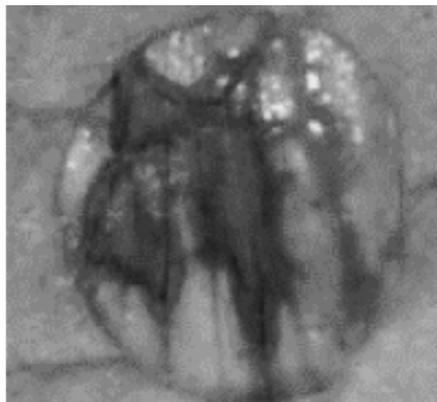
Tabla 3. Microorganismos fijadores de nitrógeno (Continuación)

EAN 3.3	Rosada, circular, pequeña, elevada, brillante	Cocos gram +	Positivo
EAN 4.1	Blanca, cerosa, opaca, rizoide	Bacilos gram +	Negativo
EAN 4.2	Amarilla, pequeña, redonda, elevada	Cocos gram +	Positivo
EAN 4.3	Blanca, granular, plana, brillante	Bacilos gram -	Positivo
EAN 5.1	Cremosa, puntiforme, elevada, pequeña	Bacilo gram -	Positivo
EAN 5.2	Blanca, cerosa, irregular, grande	Bacilo gram +	Negativo
EAN 5.3	Blanca cerosa, regular, grande	Bacilo gram +	Negativo

Fuente. Elaboración propia de los autores.

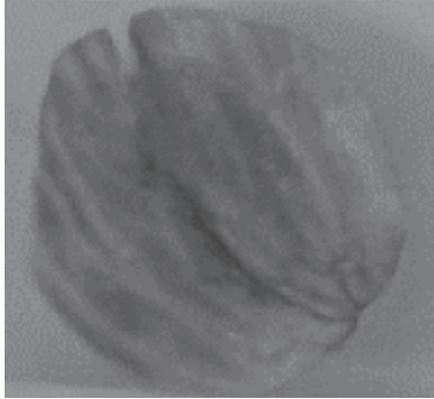
Los 10 morfotipos seleccionados corresponden a microorganismos de tipo no esporulados. Una vez se realizó la selección de los diazotrofos, se procedió a evaluar si eran posibles patógenos usando como indicador las hojas internas de *Lactuca sativa* (Figura 6; Figura 7).

Figura 6. Pruebas de patogenicidad en *L. sativa* (patogenicidad positiva, morfotipo EAN 2.3)



Fuente. Elaboración propia de los autores.

Figura 7. Pruebas de patogenicidad en *L. sativa* (patogenicidad negativa, morfotipo EAN 1.2)



Fuente. Elaboración propia de los autores.

Como se observó anteriormente (Figura 6), la lesión realizada por el morfotipo EAN 2.3 donde se genera una degradación del tejido vegetal por parte del microorganismo, efectos similares mostraron los morfotipos EAN 3.2, 4.2 y 4.3. Por otro lado, aquellos morfotipos que no produjeron lesiones en el tejido vegetal, más allá de la lesión generada por la inoculación (Figura 7) que corresponden a los morfotipos EAN 1.2, 1.3, 2.2, 3.1, 3.3 y 5.1, mostraron el 60% de los morfotipos no patógenos para las plantas.

Por lo anterior, luego de la bioprospección realizada en el canopy urbano de la Universidad EAN, se considera que los microorganismos descritos (Tabla 4) pueden ser elegidos para el desarrollo de un consorcio de bacterias diazotróficas y con un potencial para el desarrollo de productos sostenibles ambientalmente, como sería la formulación de un biofertilizante que pueda ser aprovechado tanto en la Universidad EAN como en otros techos verdes que se encuentren en la ciudad.

Tabla 4. Microorganismos seleccionados para lo conformación del consorcio de diazótrofos

Morfotipo	Descripción macroscópica	Descripción microscópica	Fijador de nitrógeno
EAN 1.2	Crema, redonda, elevada, cremosa, pequeña	Bacilo gram -	Positivo
EAN 1.3	Amarillo claro, fusiforme, planas, enteras, brillantes	Cocos gram +	Positivo
EAN 2.2	Amarilla, pequeña, brillante, elevada, pequeña	Cocos gram +	Positivo
EAN 3.1	Crema, fusiforme, elevada, brillante	Bacilo gram -	Positivo
EAN 3.3	Rosada, circular, pequeña, elevada, brillante	Cocos gram +	Positivo
EAN 5.1	Cremosa, puntiforme, elevada, pequeña	Bacilo gram -	Positivo

Fuente. Elaboración propia de los autores.

Es importante mencionar que es fundamental realizar una identificación de los seis morfotipos seleccionados, aunque en los laboratorios de la Universidad EAN se cuenta con un kit para identificación de pruebas bioquímicas enfocado a la detección de microorganismos entéricos gram negativos; ninguno de los seis morfotipos seleccionados son fermentadores de lactosa.

4. Conclusiones

Procesos como la bioprospección permiten identificar y caracterizar microorganismos benéficos para el ambiente, específicamente aquellos involucrados en los ciclos bio-geoquímicos que pueden ser aprovechados a futuro a nivel industrial para la producción de fertilizantes orgánicos o como controladores biológicos de plagas.

La presencia de diazotrofos en el canopy urbano de la Universidad EAN, al igual que en distintos ecosistemas, hacen que se consideren microorganismos ubicuos y solo depende del interés del investigador aprovechar su potencialidad.

La selección de microorganismos diazotrofos en suelos del canopy urbano se convierte en un potencial para la formulación de un biofertilizante que pueda ser usado como un producto alternativo para el cuidado de los cultivos tanto ornamentales como agrícolas.

La identificación de los morfotipos es esencial para determinar el tipo de microorganismos que hacen parte del producto a ofrecer en un futuro y evitar la aplicación de bacterias que sean potencialmente riesgosas para la salud de las personas, plantas y animales.

5. Referencias bibliográficas

- Acuña A.J., Pucci, G.N., y Pucci, O.H. (2010). *Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradadas hidrocarburos aisladas de la Patagonia*. *Ecosistemas* 19 (2), 125-136.
- Alarcón A. y Ferrera, R. (2000). *Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura*. *Agricultura Técnica en México*: 26(2),191-203.
- Armenta-Bojorquez, A, C., García Gutiérrez, J. R., Camacho Baez, M., Apodaca Sánchez, A., Montoya, L., y Nava Pérez, E. (2010). *Role of biofertilizers in the agricultural development in Mexico*. *Ra Ximhai* 6(1). 51-56.
- Baca, B., Soto, L., y Pardo, M. (2000). *Fijación biológica de nitrógeno*. *Elementos* 38, pp. 43-49.
- Bannert, A., Kleineidam, K., Wissing, L., Mueller-Niggemann, C., Vogelsang, V., Welzl, G., Cao, Z., & Schloter, M. (2011). *Changes in Diversity and Functional Gene Abundances of Microbial Communities Involved in Nitrogen Fixation, Nitrification, and Denitrification in a Tidal Wetland versus Paddy Soils Cultivated for Different Time Periods*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6109–6116.
- Grageda-Cabrera O, Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J., y Vera-Nuñez, J. (2012). *Impacto de los biofertilizantes en la agricultura*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261-1274.

- Hashidoko, Y., Motohiko, T., Osaki, M., & Tahara, S. (2002). *Soft gel médium solidified with gella gum for preliminary screening for root-associating, free living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizoplan of plants*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 2259-2263.
- López, M., Martínez-Viera, R., Brossard Fabré, M., Bolívar, A., Alfonso, N., Alba, A., y Pereira Abreo, H. (2008). *Bacterial biofertilizers effect on the growth of a maize cultivar in two venezuelans contrasting soils*. Agronomía Trop. 58(4), 391-401
- Wilson, S., Böttjer, D., Church, M J. & Karl, D M. (2012). *Comparative Assessment of Nitrogen Fixation Methodologies, Conducted in the Oligotrophic North Pacific Ocean*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(18), 6516-6523.
- Zhang, Y., Pohlmann, E., & Roberts, G. (2005). *GlnD Is Essential for NifA Activation, NtrB/NtrC-Regulated Gene Expression, and Posttranslational Regulation of Nitrogenase Activity in the Photosynthetic, Nitrogen-Fixing Bacterium Rhodospirillum rubrum*. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1254–1265.

Bibliografía

- Bashan Y, H Levanony, R Ferrera-Cerrato. 1996. *Interacciones entre plantas y microorganismos beneficios: II bacterias asociativas de la rizosfera*. Terra 14(1), 159-183.
- Bodelier, P. L., Libochant, J. A., Blom, C. W. P. M. & Laanbroek, H. J. (1996). *Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats*. Appl. Environ. Microbiol. 6, 3100–4107

- Carrizo-de Bellone, S., & Bellone, C. H. (2006). Diazotrofos en vainas de hojas de caña de azúcar aportan nitrógeno al cultivo con las precipitaciones pluviales. *Terra Latinoamericana* 24(4), 489-492.
- Freitag, T., & Prosser, J. I. (2003). *Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria within Anoxic Marine Sediments. Applied and Environmental Microbiology*. 69(3), 1359–1371
- Hernández, A., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez, V. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana* 21(1), 81-89.
- Koops, H.-P., & Pommerening-Rosner, A. (2001). *Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species*. FEMS Microbiol. Ecol. 37,1–9.
- Mantilla-Paredes, A., Cardona, G., Peña-Venegas, C., Murcia, U., Rodríguez, M., y Zambrano, M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Rev. Biol. Trop.* 57 (4), 915-927
- Nold, S., Zhou, J., Devol, A., & Tiedje, J. (2000). Pacific Northwest Marine Sediments Contain Ammonia-Oxidizing Bacteria in the b Subdivision of the Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4532-4535.
- Oliveira, A., Canuto, E., Silva, E., Reis, V., & Baldani, J. (2004). Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 295-299.

- Orozco-Jaramillo, C., y Martínez-Nieto, P. (2009). Evaluation of inoculation with asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms isolated from rhizosphere of *Pinus patula* in Colombia. *BOSQUE* 30(2), 70-77.
- Rennie, R.J. (1981). A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27, 8-14.
- Rozycki, H., Dahm, H., Strzelczyk, E. & Li, C.Y. (1999). Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.). *Applied Soil Ecology* 12, 239-250.
- Saeed, B., Sajjad, M., Bano Malik, K. (2007). Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and phytohormone-producing *Enterobacter* strains. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47 (8), 1008–1015.
- Salazar E, J Díaz-Mejía, G Moreno-Hagelsieb, G Martínez-Batallar, Y Mora, J Mora and S Encarnación. 2010. Characterization of the *NifA-RpoN* Regulon in *Rhizobium etli* in Free Life and in Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(13), 4510–4520.
- Santillana Villanueva, N. (2006). Biofertilizers production using *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada*, 5(1,2), 87-91.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmidt, M., Cirpus, I., Strous, M., Bock, E., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. M. (2002). Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria—competitors or natural partners? *FEMS Microbiol. Ecol.* 39,175–181.

- Silva, K., Nóbrega, R., Lima, A., Barberi, A., F de Souza Moreira. (2011). *Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. Sci. Agric. 68(5), 518-525.*
- Siviero, M., Marega, A., Dos Santos, D., Roselli, R., Yun, S., Abonizio, I., Sayuri, L., Castro, C., Horta, M., Zangaro, W., Nogueira, M., Andrade, G. (2008). *Interaction among N-fixing bacteria and AM fungi in Amazonian legume tree (Schizolobium amazonicum) in field conditions. Applied Soil Ecology 39 (2): 144-152.*
- Stella, M., & Suhaimi, M. (2010). *Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 38(2): 211–219*
- Terry, E., A. Leyva y Hernández, A. (2005). *Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (Lycopersicon esculentum, Mill). Revista Colombiana de Biotecnología 5(2): 47-54.*
- Villanueva Tarazona, E., & Quintana Díaz, A. (2010). *Isolation and selection of rhizobia native bacteriae nitrogenfixing from Phaseolus vulgaris root nodules. REBIOL 32(1), 24.30.*
- Vives, M. & Garnica, D. (2006). *Comparison of virulence between clinical and environmental Pseudomonas aeruginosa isolates. Int. Microbiol. 9, 247-252.*
- You, M., Nishiguchi, Saito, A., Isawa, T., Mitsui, H., & Kiwamu Minamisawa. (2005). *Expression of the nifH Gene of a Herbaspirillum Endophyte in Wild Rice Species: Daily Rhythm during the Light-Dark Cycle. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), 8183–8190.*