



Mitigación del estrés por sequía e inundación en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA BACTERIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C., JUNIO 2019



**Mitigación del estrés por sequía e inundación en plantas de tomate (*Lycopersicum
esculentum*) por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.**

**PAOLA ANDREA MONTENEGRO GUZMAN
MARÍA FERNANDA MORALES HERNÁNDEZ**

JAVIER VANEGAS GUERRERO
Asesor externo

VILMA YAMILE MARTINEZ GRANADOS
Asesor interno

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C., JUNIO 2019**

DEDICATORIA

Dios es quien hace todo posible y abre caminos maravillosos en nuestra vida, por esta razón este trabajo quiero dedicárselo en primer lugar a Dios por permitirme hoy estar más cerca de alcanzar un título profesional, a mi madre por su apoyo incondicional y su constante lucha por brindarme siempre más de lo que sus posibilidades le permitían, a mi esposo que ha hecho parte de todo este proceso con paciencia, guiando y aconsejando en los momentos en los que las fuerzas se agotan o se pierde el horizonte y por compartir conmigo hoy la dicha de ser padres y conocer juntos el amor de nuestras vidas; mi más sincero agradecimiento a los tres por su fiel amor, son el pilar de mi vida por eso este logro solo puede ir dedicado a ustedes.

María Fernanda Morales Hernández

A Dios porque ha estado conmigo dándome fortaleza a cada paso que doy, a mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional en este proceso académico sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad, motivándome a ser mejor persona y a no dejarme vencer frente a las adversidades.

Paola Andrea Montenegro Guzmán

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de forma sincera a todas aquellas personas que hicieron parte de este proceso, que, aunque pudieron presentarse algunas dificultades logramos superar cada uno de los obstáculos y fortalecernos como personas y profesionales, de forma especial a:

El profesor Javier Vanegas Guerrero Dr. MSc, nuestro asesor externo por brindarnos la oportunidad de hacer parte de su equipo de trabajo, guiarnos y acompañarnos en cada uno de los procesos desarrollados en este trabajo.

La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos las herramientas y conocimientos necesarios para crecer como profesionales y la Universidad Antonio Nariño por permitirnos desarrollar nuestro trabajo de grado en sus instalaciones, y acogernos como uno más de sus estudiantes en cada uno de sus laboratorios.

Este trabajo fue financiado por el Organismo Internacional de Energía Atómica - OIEA mediante el Acuerdo Regional de Cooperación para la promoción de la Ciencia y la Tecnología Nuclear en América Latina y el Caribe - ARCAL RLA 5078 "Mejora de las prácticas de fertilización en los cultivos mediante el uso de genotipos eficientes, macronutrientes y bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (ARCAL CLVII)"

A nuestros familiares y amigos en especial Yuliet Mosquera por acompañarnos y compartir con nosotras tardes de mucha risa.

A todos, muchas gracias.

María Fernanda Morales Hernández

Paola Andrea Montenegro Guzmán

Tabla de contenido

Introducción.....	12
Objetivos.....	15
Objetivo general:.....	15
Objetivos específicos:.....	15
1. Antecedentes.....	16
1.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	16
1.2 Mitigación de estrés hídrico.....	18
1.3 Enzimas en suelo.....	19
2. Marco teórico.....	21
2.1 Importancia del cultivo de tomate en Colombia.....	21
2.2 Rizobacterias.....	21
2.3 Rizobacterias Promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).....	22
2.4 Estrés por sequía e inundación.....	22
2.5 Ácido Indolacético.....	23
2.6 Actividad enzimática en suelos.....	23
2.6.1 Fosfatasa alcalina y ácida.....	23
2.6.2 Arilsulfatasa.....	23
3. Diseño metodológico.....	24
3.1 Diseño de investigación.....	25
3.2 Hipótesis.....	25
3.3 Metodología.....	25
3.3.1 Objetivo 1.....	25
3.3.2 Objetivo 2.....	28
3.3.3 Objetivo 3.....	29
4. Resultados.....	31
5. Discusión.....	44
6. Conclusiones.....	48
Referencias bibliográficas.....	49

Índice de tablas

Tabla 1. Caracterización de aislamientos obtenidos de suelo rizosférico a 42 y 30°C, ácido indolacético (AIA) y fluorescencia.....	31
Tabla 2. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la longitud, peso seco de raíz, vástago y total en plántulas de tomate.	32
Tabla 3. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la longitud, peso seco de raíz, vástago y total frente al estrés por sequía en plántulas de tomate.	33
Tabla 4. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la longitud, peso seco de raíz, vástago y total frente al estrés por inundación en plántulas de tomate	34

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama general del diseño metodológico.....	24
Figura 2. Actividad enzimática de Arilsulfatasa para aislamientos seleccionados del ensayo de promoción de crecimiento.	35
Figura 3. Actividad enzimática de Fosfatasa ácida para aislamientos seleccionados del ensayo de promoción de crecimiento.....	36
Figura 4. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina para aislamientos seleccionados del ensayo de promoción de crecimiento.....	37
Figura 5. Actividad enzimática de fosfatasa ácida para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en sequía.	38
Figura 6. Actividad enzimática de fosfatasa ácida para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en inundación.....	39
Figura 7. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en sequía.	40
Figura 8. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en inundación.....	41
Figura 9. Actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina para los aislamientos de papa.	42
Figura 10. Actividad enzimática de Fosfatasa Ácida para los aislamientos trabajados.	43
Anexos	58
Anexo 1. Ficha técnica semillas de tomate variedad rio grande.....	58
Anexo 2. Medio mínimo M9.....	59

Anexo 3. Medio LB	60
Anexo 4. Solubilización de fosforo en medio SRS.....	61
Anexo 5. Composición del medio NFb, libre de nitrógeno	62
Anexo 6. Protocolo AIA	63
Anexo 7. Protocolo de lavado y desinfección de semillas.	64
Anexo 8. Solución nutritiva Hoagland.	65
Anexo 9. Protocolo para ajuste del inóculo.	67
Anexo 10. Determinación de Arilsulfatasa en suelo.....	68
Anexo 11. Determinación de fosfatasa ácida y alcalina en suelo.	73
Anexo 12. Determinación de fosfatasa ácida y alcalina en los aislamientos	79
Anexo 13. Curvas de calibración reactivos actividad enzimática en suelo.....	81



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

Mitigación del estrés por sequía e inundación en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

RESUMEN

Actualmente, la agricultura ecológica busca obtener productos biológicos que tengan efectos en la promoción de crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos, mejorando las condiciones del suelo y aumentando la productividad de las cosechas. El objetivo de este trabajo fue determinar la mitigación del estrés por sequía e inundación en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). Para esto de forma inicial se seleccionaron rizobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal en plantas de tomate, posterior a esto se determinó el crecimiento de plantas de tomate al ser inoculadas y sometidas a estrés de sequía e inundación, por último, se comparó la actividad enzimática en suelos con y sin estrés hídrico. Plántulas de tomate fueron inoculadas con quince rizobacterias. Luego de 31 días, ocho aislamientos presentaron aumentos en peso seco de raíz hasta siete veces con respecto al control. El aislamiento LZ30 presentó la mayor actividad arilsulfatasa con un 80,39%. Mientras, el aislamiento LZ10 presentó la mayor actividad fosfatasa ácida y alcalina con un 32,04% y 340,13%. Bajo condiciones de estrés por sequía, los aislamientos LZ5, LZ7, LZ6 LZ62 y LZ63 incrementaron en peso seco de raíz entre el 52-142% con respecto al control no inoculado. El aislamiento LZ6 presentó la mayor actividad fosfatasa ácida y alcalina, con un 309% y 247,96%. Mientras, bajo condiciones de inundación los

aislamientos LZ4, LZ38, LZ2, LZ5 y LZ3 presentaron aumentos en peso seco de raíz entre el 50-78% con respecto al control. El aislamiento LZ4 presentó la mayor actividad fosfatasa ácida (284,63%) y LZ5 la mayor actividad alcalina (345,19%). Estos resultados demuestran que la inoculación de PGPR permite un adecuado crecimiento de los cultivos *Lycopersicum esculentum* bajo condiciones de estrés por sequía e inundación y aumentan la actividad microbiana en el suelo.

Palabras claves: PGPR, rizobacterias, estrés hídrico, actividad enzimática, *Lycopersicum esculentum*.

Estudiantes: María Fernanda Morales Hernández, Paola Andrea Montenegro Guzmán.

Docentes: Javier Vanegas Guerrero (asesor externo), Vilma Yamile Martínez Granados (asesor interno).

Fecha: Abril, 2019.

Introducción.

Desde hace varios años el cambio climático y el acelerado desgaste del medio ambiente que se vive actualmente a nivel mundial, han traído grandes consecuencias para la industria agrícola y diferentes producciones y cultivos, entre ellos, se encuentran las hortalizas, que representan un valor muy importante en el consumo de una dieta habitual para los seres humanos y en donde es posible evidenciar un impacto económico en toda la cadena productiva, por esta razón es considerable plantear e implementar técnicas amigables con el medio ambiente, que tengan alto impacto en el óptimo desarrollo de las producciones agrícolas y permitan un adecuado crecimiento de los cultivos, aun cuando el ambiente externo pueda llegar a ser extremo.

Colombia cuenta con un territorio agrícola del 18,9%, mientras que el PIB (Producto interno bruto) agropecuario ha contribuido el 8% del PIB total y genera el 21% del total de empleos del país, pero, la agricultura nacional ha sido históricamente golpeada por una variabilidad climática a la que ha sabido sobreponerse. Sin embargo, en los últimos tiempos los fenómenos climáticos extremos han representado una constante amenaza para el sector agrícola teniendo en cuenta los periodos prolongados de lluvias experimentados durante los años 2010-2011, por lo que se considera indispensable evaluar la probabilidad de futuras pérdidas analizando próximos escenarios. Comunicados nacionales recientes advierten que entre los años 2011-2040 se estiman niveles elevados de vulnerabilidad en el sector agrícola principalmente en minifundios campesinos con alta emergencia en los departamentos de Cesar, Nariño, Cauca, Tolima, Magdalena, Córdoba y Antioquia. Los impactos potenciales altos podrían alcanzar el 50% de la superficie dedicada a las pasturas; el 57% de las áreas de cultivos permanentes y semipermanentes, el 71% del área sembrada de café y el 47% de los minifundios campesinos¹.

Así mismo, en el año 2015 de acuerdo con la Asociación Hortifrutícola de Colombia, Asohofrucol, se estimaron siete departamentos del país con afectaciones en los cultivos de frutas, hortalizas y aromáticas, como consecuencia del verano, Bolívar estuvo entre los departamentos más afectados, allí la sequía ocasiono una reducción hasta del 60% en la producción de los cultivos de piña. Igualmente, se vieron afectaciones críticas en los cultivos de plátano, mango,

guayaba agria y guayaba dulce, carambolo, ciruela, maracuyá, cereza, aguacate, tomate, ají tabasco y mango de hilaza. Adicionalmente, se experimentó una disminución en las cosechas e incremento de la presencia de plagas y enfermedades como la fumagina, antracnosis, hormigas, afidios, comején, entre otros, lo cual contribuye a que los costos de producción aumenten. Lo que dejo como resultado cerca de 5.500 productores perjudicados por el verano².

Las plantas para subsistir dependen de sistemas propios, pero estos pueden ser estimulados a favor de las actividades microbianas rizosféricas que median la adaptación al estrés. Por otra parte, la gestión de las comunidades microbianas asociadas a la planta, es otra estrategia relevante para atenuar el efecto negativo de factores perjudiciales como la sequía e inundación³, del mismo modo, el estudio y selección de las poblaciones de rizobacterias autóctonas, puede contemplarse como una estrategia eficaz que aumenta el potencial de microorganismos beneficiosos al ser aplicados en suelos deteriorados que han sufrido un estrés previo. Así mismo la selección de microorganismos específicos e inoculación bacteriana, ha sido reconocida como una práctica interesante para aumentar el crecimiento vegetal⁴ y conocer la estructura microbiana del suelo es esencial para el establecimiento de plantas en condiciones no favorables⁵.

Las problemáticas ambientales que enfrentan los productores de hortalizas en Colombia juegan un papel importante en la agronomía, estas se ven reflejadas en la alta incidencia de plagas, la degradación del medio ambiente y el mal manejo de los suelos, que en su conjunto y en el tiempo han venido influyendo negativamente en los rendimientos y calidad de producción⁶. Esto se evidencia en el aumento de las actividades agrícolas que se han intensificado durante el último siglo, no solo en nuestro país sino en todo el mundo; tradicionalmente se han adoptado modelos productivos que se caracterizan por la dependencia de insumos externos y la conversión de los suelos, lo cual ha incrementado la productividad, con consecuencias desfavorables que afectan la sostenibilidad de los agroecosistemas⁷.

La agricultura es dependiente del uso de agroquímicos, que en la mayoría de las prácticas agrícolas se exceden en cantidad por parte de los agricultores, lo que genera efectos negativos al suelo en cuanto a la concentración de nutrientes, retención de agua y fertilidad entre otros⁸.

Teniendo en cuenta todos los efectos adversos del uso prolongado de fertilizantes químicos y el cambio climático, la agricultura ecológica busca obtener productos biológicos que tengan efectos en la promoción de crecimiento de las plantas, mediante mecanismos como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de hormonas, entre otros, mejorando las condiciones del suelo y aumentando la productividad de las cosechas, como se ha demostrado en bacterias y hongos promotores de crecimiento vegetal⁹.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, la razón de este estudio es contribuir a la producción de hortalizas brindando al agricultor opciones que le permitan tener mayor rentabilidad de sus cultivos y menos efectos negativos al ambiente. Esto mediante la determinación de la mitigación del estrés por sequía e inundación en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal; para cumplir con este objetivo se realizará la selección de rizobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal en plantas de tomate. Se determinará el crecimiento de plantas de tomate al ser inoculadas y sometidas a estrés de sequía e inundación, con y sin rizobacterias y se evaluará la actividad enzimática en suelos con y sin estrés hídrico, enriquecido con rizobacterias y sin ellas.

Objetivos.

Objetivo general:

Determinar la mitigación del estrés por sequía e inundación en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar rizobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal en plantas de tomate.
2. Determinar el crecimiento de plantas de tomate al ser inoculadas y sometidas a estrés de sequía e inundación, con y sin rizobacterias.
3. Evaluar la actividad enzimática en suelos con y sin estrés hídrico, enriquecido con rizobacterias y sin ellas.

1. Antecedentes.

1.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Gómez et al.,¹⁰ evaluaron el efecto *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento de plantas de guayaba. Ellos aislaron bacterias con la capacidad de crecer en un medio selectivo con 1- ácido carboxílico y -1- aminociclopropano. Los aislamientos fueron evaluados para la actividad de ACC desaminasa, la resistencia a antibióticos, confrontación con hongos fitopatógenos, pruebas de crecimiento de plantas *in vitro* y perfiles metabólicos BIOLOG. Encontraron 30 aislamientos con actividades ACC, siete con efecto de control biológico y cinco con efecto en el desarrollo de la raíz *in vitro*¹⁰.

Angulo et al.,¹¹ aislaron rizobacterias y endófitos de árboles de *Eucalyptus nitens*. Los aislamientos con incremento del crecimiento de las plántulas, se caracterizaron por su capacidad de producir ácido indolacético (AIA), solubilizar fosfato y expresar la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. De 105 aislamientos, 15 tuvieron un crecimiento significativo de plántulas de *E. nitens* con incrementos en peso seco de vástago (142%) y raíz (135%), altura de las plantas (50%) y el largo de las raíces (45%). Las rizobacterias pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus*. Los aislados identificados como *A. phenanthrenivorans* 21 y *B. cereus* 113 incrementaron la germinación de *E. nitens* a los 12 días en un valor promedio de 3,15 veces con relación al control. *R. aquatilis* 78 presentó la mayor producción de AIA en presencia de triptófano y el mayor índice de solubilización de fósforo. *B. amyloliquefaciens* 60 fue positivo para la actividad ACC desaminasa. Los resultados indican el potencial de las rizobacterias como promotoras de crecimiento de plántulas de *E. nitens* y su posible uso como inoculantes¹¹.

Santillana et al.,¹² evaluaron el efecto de 19 aislamientos de *Rhizobium* en la germinación y en el crecimiento de plantas de *Lycopersicon esculentum*. Nueve *Rhizobium* estimularon la germinación de las semillas de tomate, mientras que siete cepas *Rhizobium* promovieron el crecimiento de plantas de tomate. Los *Rhizobium* PEVF02 y PEVF08 tuvieron un efecto

significativo positivo en la germinación y en el crecimiento de las plantas de tomate, por lo cual se podrían recomendar como potenciales PGPR en este cultivo¹².

Cedeño et al.,¹³ evaluaron el efecto de *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas veronii* R4 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0 para promover el desarrollo e incremento de productividad en tres variedades de soja: ICA-P34; INIAP-308; INIAP-307. Luego de 7 y 30 días fue valorado el desarrollo de las raíces y formación de nódulos, por co-inoculación de rizobacterias y sin inoculantes, también se determinó el rendimiento. En condiciones *in vitro* se incrementó el tejido radicular con 5, 3 y 9 cm de largo, por *B. japonicum* en ICA-P34, INIAP-308 y INIAP-307. En plántulas se encontraron raíces de 21 y 20 cm en INIAP-307 con *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* CHA0. Inoculando las tres variedades con *B. japonicum*, se obtuvo 10, 14 y 10 nódulos por planta, cuando se aplicó *Pseudomonas* spp no existió formación de nódulos. El rendimiento de granos por hectárea fue 3700, 2890 y 3929 kg ha⁻¹, con *B. japonicum*, sin inóculo bacteriano, los rendimientos disminuyen a 2006, 1611 y 1842 kg ha⁻¹. *B. japonicum* coloniza el sistema radicular influyendo con cambios morfológicos y fisiológicos, que positivamente incrementa el rendimiento en semillas de soja¹³.

Pérez et al.,¹⁴ realizaron la búsqueda, selección y caracterización de PGPR de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* de rizósfera de cultivos de *Ipomoea batatas* de zonas productoras del Caribe Colombiano. Las cepas fueron probadas en invernadero en plántulas de *Ipomoea batatas* producidas *in vitro* en las que se evaluó la altura, longitud radicular, masa seca de la parte aérea y radicular. Asociada a la rizósfera de *Ipomoea batatas* se obtuvieron cepas de *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas denitrificans*. Las cepas fueron capaces de solubilizar fósforo, producir índoles y reducir acetileno. Se obtuvo incrementos en parámetros de crecimiento como longitud radicular, altura, peso seco aéreo y radicular en plántulas de *Ipomoea batatas* en invernadero con la inoculación de las bacterias seleccionadas frente a plántulas sin inocular¹⁴.

Becerra et al.,¹⁵ evaluaron el efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en plantas de cilantro y la utilización de la práctica de quema de cascarilla de arroz en la

preparación del suelo para el establecimiento del cultivo. Emplearon un diseño experimental en parcelas divididas, las parcelas principales correspondieron a la preparación del suelo con quema de cascarilla de arroz y sin quema con la inoculación previa de *Trichoderma* sp. Las subparcelas eran los tratamientos con la inoculación simple y en co-inoculación de *Azospirillum* RZH132 y *Azotobacter* RZH120. Los resultados mostraron un efecto positivo en el crecimiento de las plantas inoculadas con las rizobacterias en las dos parcelas con quema y sin quema de cascarilla de arroz; sin embargo, en la variable rendimiento no se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Así mismo, se encontró que la población de bacterias rizosféricas en los medios de cultivo NFb semisólido, Ashby y King B, se vio favorecida por la no quema de cascarilla de arroz en el suelo. Es importante resaltar que los resultados se obtuvieron con la disminución al 30% de la fertilización química, con lo cual se puede reducir el uso de estos productos químicos¹⁵.

1.2 Mitigación de estrés hídrico

Murcia et al.,¹⁶ evaluaron siete aislamientos productores de ácido indolacético (AIA) para estimular la germinación de Maracuyá y Badea ante situaciones de estrés hídrico. Las cepas no causaron un aumento en la germinación de semillas, pero sí en la longitud de plántulas de maracuyá. Las cepas Y16 y P8 presentaron la mayor producción de AIA ($8,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $7,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente), aumentaron el número de raíces secundarias, incrementaron la biomasa y longitud de tallo y raíz, y brindan tolerancia en respuesta a una situación de déficit hídrico¹⁶.

Bécquer et al.,¹⁷ evaluaron en campo bajo condiciones de estrés por sequía el efecto de la inoculación de *Bradyrhizobium* sp y *Trichoderma harzianum*, en triticale (*X. Triticosecale Wittmack*). La aplicación simple de *Bradyrhizobium* o en combinación con *Trichoderma*, de forma general, ejerció un efecto positivo en las plantas, y resultó superior a la aplicación de fertilizante químico. Se observó que el desarrollo de la parte aérea y el rendimiento de grano no estuvieron vinculados con la aplicación de nitrógeno mineral, sino con la inoculación¹⁷.

Abril et al.,¹⁸ evaluaron el grado de colonización de raíces de *Azospirillum* spp bajo condiciones de campo en la Región semiárida central de la Argentina. El grado de colonización mostró alta

variabilidad entre los casos analizados (CV 173%, rango: -18 a >100%). Sólo 11 de los 32 casos analizados presentaron diferencias significativas entre el tratamiento inoculado y el control. No se detectó un patrón definido que permita explicar la alta heterogeneidad de los resultados. Sin embargo, se podría especular, que los principales factores que pueden haber afectado el grado de colonización son: el estrés hídrico y el origen de las cepas del inoculante. Bajo condiciones de estrés puede existir una fuerte competencia entre las poblaciones rizosféricas, situación en la cual, las cepas nativas tienen ventaja por su mayor adaptación al medio¹⁸.

1.3 Enzimas en suelo

Torres et al.,¹⁹ estudiaron las poblaciones de bacterias en cultivos de cebolla (*Allium ampeloprasum*) y papa (*Solanum tuberosum*). Las bacterias solubilizadoras de fósforo (P) se encontraron en menor proporción que los grupos funcionales del ciclo del carbono (C) y mantienen tamaños poblacionales similares a las bacterias fijadoras de nitrógeno (N), tanto en rizosfera como en suelo total. Según los resultados, la diferencia en la proporción de microorganismos entre rizosfera y el suelo circundante puede variar por las labores de adición de fertilizantes. Adicionalmente, se determinó que la actividad de la fosfatasa ácida pudo estar afectada por factores como el porcentaje de materia orgánica, la biomasa bacteriana y la disponibilidad de fósforo (P)¹⁹.

Yoshioka et al.,²⁰ evaluaron en suelo rizosférico de plátano (*Musa AAB*) la actividad de fosfatasas ácida y alcalina. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre manejos, presentándose mayor actividad de fosfatasa ácida en el tradicional y de fosfatasa alcalina en el manejo químico. Con respecto a la profundidad, para ambas enzimas la mayor actividad se encontró de 0-5 cm. En referencia a las edades del cultivo, la máxima actividad de fosfatasa ácida se presentó en la etapa de diferenciación floral (6 meses) y la máxima actividad de fosfatasa alcalina en la época de floración (12 meses) y cosecha (18 meses). Dado el carácter ácido del suelo estudiado (pH 5.1), la fosfatasa ácida presentó el 85% de la actividad y el restante 15% fue para fosfatasa alcalina. La actividad de fosfatasa ácida y alcalina está influenciada por el manejo agronómico y estado fisiológico del cultivo de plátano. El estudio de la dinámica

enzimática permite visualizar cambios a corto plazo producidos por factores antropogénicos y asociados con producción de cultivos de plátano²⁰.

Cerón et al.,²¹ evaluaron la calidad de suelos y sedimentos mediante las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa y o-difenol oxidasa. Se puede considerar que la respuesta de las actividades enzimáticas y su posible relación con el gradiente de contaminación presente en la cuenca alta de río arzobispo, indican amenaza de degradación de los suelos²¹.

Castillo et al.,²² evaluaron el efecto de la aplicación de vinaza en las propiedades químicas y la actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas de dos suelos del Valle del Cauca en maíz dulce. Se establecieron los siguientes tratamientos: T1, 100% del K⁺ con vinazas, T2, 100% de K⁺ con KCl, T3, 50% de K⁺ con Vinaza y 50% con KCl, y T4, 75% del K⁺ con vinaza y 25% con KCl, T5 fue el testigo absoluto sin planta y T6 el testigo más planta. Las evaluaciones se realizaron en un periodo de 76 días y las muestras se tomaron entre 0-5 cm de profundidad. El pH, K⁺, B y relación Ca + Mg/K disminuyeron, muy significativamente (p<0,01), mientras que los contenidos de K y B se incrementaron en ambos suelos. Las fosfatasas alcalinas fueron significativamente mayores y su máxima actividad ocurrió a los 10 días después de la siembra, por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre suelos con referencia a las fosfatasas ácidas y su mayor actividad ocurrió a los 38 días. Al hacer análisis multivariado no se encontraron relaciones entre la actividad enzimática y los análisis químicos²².

2. Marco teórico.

2.1 Importancia del cultivo de tomate en Colombia

El tomate es la principal hortaliza que se cultiva en el mundo, las variedades más utilizadas son, chonto, cherry y milano. Actualmente, China cuenta con el primer lugar en producción agrícola de tomate, seguido de India, Estados Unidos, Turquía y Egipto, con un total de 177.042.000 toneladas producidas para el año 2016, Colombia se encuentra ubicado en el puesto No. 30 en la producción mundial de tomate²³.

La horticultura es una de las principales actividades económicas en Colombia, el cultivo de tomate tiene gran relevancia gracias a la alta demanda que tiene para la dieta alimenticia, pues es un producto que se consume con frecuencia en el país sin importar la época del año, adicional a esto, el cultivo contribuye a la generación de empleo y su aporte económico al campo y la industria nacional, teniendo en cuenta que estos cultivos siempre van asociados con el pequeño y mediano agricultor, por otro lado, el tomate es considerado un fruto con gran cantidad de vitaminas, minerales, proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido salicílico y un alto contenido de agua, con un gran uso gastronómico debido a su agradable sabor y aspecto llamativo²⁴. El tomate puede ser cultivado durante todo el año, pero las heladas y el calor excesivo pueden dificultar su buen desarrollo, generando así un fuerte impacto en la canasta familiar y en la economía de los agricultores, la producción de tomate se realiza a lo largo de todo el territorio nacional, siendo Norte de Santander el departamento más productivo, seguido de Antioquia, Boyacá, Santander y Cundinamarca²⁵.

2.2 Rizobacterias

Las raíces de las plantas promueven un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos, debido a que tienen una humedad poco variable y un alto porcentaje de nutrientes²⁶. Se conocen como rizobacterias a un tipo de bacterias que tiene la capacidad de colonizar las raíces de algunas plantas generando una relación beneficiosa para ambas partes, existen diferentes rizobacterias de interés en la agricultura, pero tal vez unas de las más destacadas para este sector

son las rizobacterias fijadoras de nitrógeno, que se considera promueven en promedio el 65% de los requerimientos totales de este nutriente a todos los cultivos a nivel mundial²⁷.

2.3 Rizobacterias Promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

El termino PGRP o rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal hace referencia a aquellas bacterias que habitan en la rizosfera de las plantas y producen diversos beneficios para las mismas²⁸. Mendoza et al ²⁹ (2013) establecen que las PGPR estimulan el crecimiento vegetal facilitando el ingreso a las plantas de N, P y K, así como microelementos. Numerosos reportes informan que la incorporación de estas bacterias a las semillas o plántulas, favorece el desarrollo del cultivo, incrementan notablemente el vigor de la raíz y la mayor parte de las veces, la resistencia al ataque de patógenos, dicha protección que obtiene la raíz se da por la producción de compuestos antibióticos y enzimas que inducen resistencia sistémica. Los cultivos que son inoculados con PGPR generan cierta resistencia a sequía, salinidad o deficiencia nutricional debido al aumento del desarrollo radical a través de las fitohormonas que tienen efectos positivos en las plantas²⁹.

2.4 Estrés por sequía e inundación.

Las plantas, al igual que los seres humanos, son sensibles a los cambios y en respuesta a ello generan mecanismos de protección o adaptación para sobrellevar situaciones de estrés, para este caso el estrés hídrico que se genera en plantas puede presentarse tanto por sequía como por inundación, los términos de sequía e inundación hacen referencia a una condición meteorológica de ausencia o exceso de lluvias, mientras que el déficit o aumento hídrico se refiere al contenido de agua presente en un tejido o célula, para lograr resistir estas condiciones las plantas han creado diferentes medios de evasión y mecanismos de tolerancia que les permiten mejorar sus condiciones y prolongar su vida, un ejemplo de ello, es la capacidad que tienen las plantas para retardar la deshidratación o mantener la hidratación del tejido, permitiéndole economizar agua o consumirla en grandes cantidades de forma más rápida, todo esto se hace posible gracias a un sistema radicular que lo permite; la cantidad de agua disponible para la planta es determinante para su óptimo crecimiento y productividad³⁰.

2.5 Ácido Indolacético

El ácido indolacético es una auxina que se presenta en la mayoría de las plantas de forma natural, estas auxinas regulan diversos procesos naturales del desarrollo de las plantas, estimulan el crecimiento del tallo principal y reduce el crecimiento de ramales laterales, en la industria agrícola es cada vez más frecuente el uso de auxinas de síntesis microbiológica, mediante caldos de cultivo las bacterias proporcionan auxinas a diferentes plantas, convirtiéndose así en una alternativa eficiente en la agricultura ecológica³¹

2.6 Actividad enzimática en suelos

2.6.1 Fosfatasa alcalina y ácida

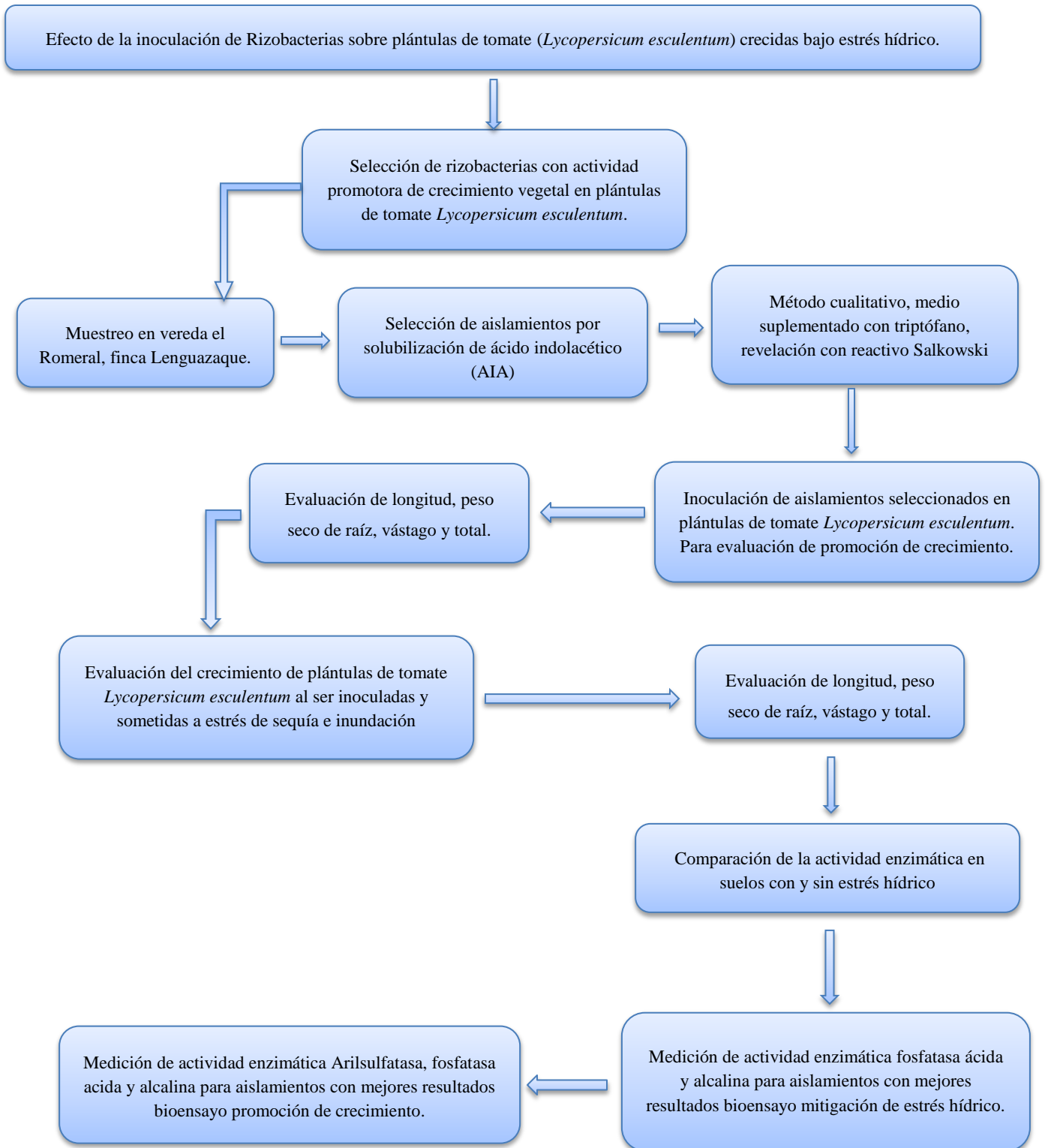
Las enzimas que se encuentran presentes en suelo son catalizadores orgánicos que tienen como función disminuir la activación de las reacciones metabólicas y permiten que esto se produzca a presiones y temperaturas a las que normalmente no se presentarían, para este caso las fosfatasas tienen la facultad de catalizar la hidrólisis de ésteres y anhídridos de H_3PO_4 ; las fosfatasas también son responsables de la mineralización del fósforo orgánico presente en el suelo y de la liberación de fósforo inorgánico que es indispensable para los microorganismos y las plantas. La fosfatasa ácida es producida por microorganismos y plantas superiores, en cuanto a la alcalina esta es producida básicamente por microorganismos³².

2.6.2 Arilsulfatasa

En suelos el azufre se presenta de forma orgánica e inorgánica, pero su posible utilización depende directamente de la mineralización de la forma orgánica, la cual es catalizada por las sulfatasas; originalmente la naturaleza presenta varios tipos de sulfatasas, entre ellas se encuentra la Arilsulfatasa, esta enzima es la encargada de catalizar la hidrólisis del anión arilsulfato por fisión del enlace O – S, dicha reacción es irreversible³³.

3. Diseño metodológico

Figura 1. Diagrama general del diseño metodológico.



3.1 Diseño de investigación.

Enfoque de la investigación: Mixto.

Tipo de investigación: Trabajo de tipo experimental.

Lugar: Este proyecto se desarrolló en los laboratorios de investigación de la Universidad Antonio Nariño donde se realizó el invernadero y la evaluación del área de estudio correspondiente.

Universo: Rizobacterias asociadas a plantas

Población: Rizobacterias en plántulas de tomate variedad Rio grande.

Muestra: 15 rizobacterias aisladas de cultivo de papa

3.2 Hipótesis.

Es posible encontrar aislamientos bacterianos que promueven el crecimiento vegetal; por medio de inoculación de rizobacterias a plantas de tomate en condiciones de invernadero, puede potencializar el crecimiento vegetal por distintos mecanismos de acción y en presencia de inóculos simples permitir la mitigación al estrés hídrico en las plántulas de tomate.

3.3 Metodología.

3.3.1 Objetivo 1.

Seleccionar rizobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal en plantas de tomate.

Variable independiente: Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Variable dependiente: Longitud, peso seco de raíz, vástago y total.

Indicador: Porcentaje de incremento del peso seco respecto al control negativo.

Técnicas: Se realizaron series de diluciones para el aislamiento bacteriano y ensayos de invernadero para promoción de crecimiento vegetal en tomate variedad Rio grande (Anexo 1).

Muestreo

Se tomaron tres plantas de papa de la finca Lenguaque del municipio de Santa Rosa de Viterbo en el Departamento de Boyacá. De cada planta se pesaron 10 gramos de suelo rizosférico para luego ser diluido en 90 ml de solución salina estéril 0,85%, esta preparación se dejó en agitación constante 120 rpm a 20°C por 24 horas.

Aislamiento

Se realizaron diluciones seriadas de la preparación anterior desde 10^{-1} a 10^{-10} , de estas diluciones fueron seleccionadas 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , que fueron sembradas en Medio Mínimo líquido suplementado con glicerol (Anexo 2), cada dilución se sembró por triplicado y se dejó incubando a 30 y 42°C hasta observar turbidez en el medio. Las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} se sembraron por agotamiento en medio sólido LB (Anexo 3). Las colonias aisladas fueron sembradas por punción en medio sólido SRS (Anexo 4), para evaluar la solubilización de fosfatos y en medio semisólido NFB (Anexo 5) para evaluar su crecimiento en un medio libre de nitrógeno. La incubación se realizó por 5 días.

Selección

Se seleccionaron 68 aislamientos que fueron sembrados en agar MacConkey a 30 y 42°C por 24 horas, de allí se seleccionaron 26 aislamientos no fermentadoras de lactosa, se hizo siembra en medio King B con glicerol al 1% para determinar la fluorescencia y en medio LB con triptófano para la producción de ácido indolacético (Anexo 6). A las cepas con mayor producción de AIA se les realizó coloración de Gram.

Lavado de Semillas.

Se utilizaron semillas variedad Río Grande, se desinfectaron (Anexo 7) para retirar el fungicida y garantizar la ausencia de otros microorganismos. Luego se hicieron tres lavados con agua destilada estéril (ADE), se lavó con alcohol al 30% durante un 1 minuto y finalmente tres lavados con ADE y posteriormente se dejaron 24 horas total oscuridad sobre una cama húmeda.

Siembra.

En turba estéril se sembraron dos semillas en semilleros de 128 pozos con alveolos de aproximadamente 50 ml. Diariamente se agregaron 1 ml de agua y 1 ml de solución nutritiva Hoagland (Anexo 8) en cada alveolo para mantener la humedad y evitar el estrés hídrico en la planta.

Pre-inóculo.

Se evaluó la pureza del aislamiento e inoculó una UFC de los aislamientos en 5 ml de caldo nutritivo en tubos centrifuga de 50 mL, se dejó en incubación por 18 h a 37°C a 200 rpm. Pasadas las 18 horas se verifico turbiedad en caldo nutritivo. El tubo se centrifugo a 7.500 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 5 ml ADE. En un espectrofotómetro el inóculo se ajustó a 0,2 absorbancias (600 nm) usando como blanco ADE (Anexo 9).

Trasplante e inoculación.

Se seleccionaron plántulas con hojas verdaderas, estas se trasplantaron a suelo no estéril y se agregó 1 ml del inóculo en turba y otro 1 ml en suelo.

Recolección de muestras.

El muestreo se realizó después de un mes bajo condiciones de invernadero. Se retiró el suelo de la raíz con agua de grifo. A las plántulas se le tomó longitud y se dividió la parte aérea y radicular. Las plantas se secaron a 50°C por 3 días en bolsas de papel Kraft. Se midió el peso húmedo y seco de la parte aérea y raíz.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza para determinar diferencias entre las medias de longitud, peso seco de raíz, vástago y total.

3.3.2 Objetivo 2.

Determinar el crecimiento de plantas de tomate al ser inoculadas y sometidas a estrés de sequía e inundación, con y sin rizobacterias.

Variable independiente: Mejores morfotipos de rizobacterias seleccionados.

Variable dependiente: Longitud, peso seco de raíz, vástago y total.

Indicador: Porcentaje de incremento del peso seco respecto al control negativo.

Técnicas: A partir de las rizobacterias seleccionadas en el objetivo 1, se realizaron dos bioensayos bajo condiciones de invernadero sometiendo las plántulas de tomate a estrés hídrico. Se tomaron como parámetros de crecimiento: longitud de la plántula, peso seco de vástago y raíz. Se usaron como control negativo plantas sin inocular, no se trabajó con un control positivo teniendo en cuenta que cada uno de los aislamientos trabajados son propios de esta investigación y sus características son objeto de estudio. Se realizó la metodología propuesta en el objetivo 1 con algunas modificaciones:

- **Siembra de semillas de tomate:** Las semillas fueron sembradas en turba estéril como se describió previamente.
- **Inoculación de las plántulas:** Se evaluaron 15 rizobacterias a 0,2 absorbancia en suelo no estéril.
- **Estrés hídrico:** Se sometieron las plántulas a dos ambientes extremos, exceso de agua (inundación de materas) y ausencia total de la misma (sequía).
- **Muestreo:** Se retiró el suelo de la raíz de la plántula y se determinaron los parámetros de crecimiento para el análisis estadístico.
- **Recolección de muestras.**

Después de un mes de estrés se retiró el suelo de la raíz con agua de grifo. A las plántulas se les determinaron los parámetros de crecimiento previamente descritos y fueron analizados estadísticamente.

3.3.3 Objetivo 3.

Evaluar la actividad enzimática en suelos con y sin estrés hídrico, enriquecido con rizobacterias y sin ellas.

Variable independiente: Mejores morfotipos de rizobacterias seleccionados.

Variable dependiente: Arilsulfatasa, fosfatasa ácida y alcalina.

Indicadores: Cuantificación mediante espectrofotometría.

Técnicas: A partir de los resultados obtenidos de los bioensayos para promoción de crecimiento y estrés por sequía e inundación se seleccionan las rizobacterias con mejores resultados en los parámetros de crecimiento. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de los tratamientos inoculados y la actividad individual de cada aislamiento.

La actividad Arilsulfatasa se realizó según Tabatabai y Bremmer, (1970) descrita por Avellaneda (2008). La actividad de la fosfatasa alcalina y ácida según Tabatabai y Bremmer (1969) y Eivazi y Tabatabai (1977) respectivamente.

Cepas seleccionadas.

Para el bioensayo de promoción de crecimiento se seleccionaron ocho aislamientos (LZ10, LZ59, LZ7, LZ30, LZ60, LZ38, LZ29 y LZ6). Para el bioensayo de sequía se usaron los aislamientos LZ63, LZ62, LZ7, LZ6, LZ5 y para estrés por inundación los aislamientos LZ3, LZ38, LZ4, LZ2 y LZ5.

Determinación de la actividad enzimática en suelo.

La actividad enzimática se evaluó siguiendo el protocolo del Anexo 10 para Arilsulfatasa de los aislamientos LZ10, LZ59, LZ7, LZ30, LZ60, LZ38, LZ29 y LZ6 del bioensayo de promoción de crecimiento. Para las fosfatasas ácida y alcalina se siguió el protocolo del Anexo 11. Para sequía los aislamientos LZ63, LZ62, LZ7, LZ6, LZ5 y para inundación LZ3, LZ38, LZ4, LZ2 y LZ5. Todos los tratamientos fueron evaluados por triplicado y sus respectivos controles. Estos suelos

fueron conservados en tubo de 50 ml a una temperatura de -20°C , cada uno de los reactivos utilizados en esta cuantificación fue conservado en frasco ámbar a una temperatura de 5°C .

Determinación de la actividad enzimática en los aislamientos.

La actividad enzimática de fosfatasas ácida y alcalina de los aislamientos se evaluó siguiendo el protocolo del Anexo 12 en los aislamientos LZ38, LZ30, LZ5, LZ7, LZ63, LZ4, LZ6, LZ60, LZ61, LZ59, LZ3, LZ62, LZ29, LZ10, LZ2.

4. Resultados.

Objetivo 1. Seleccionar rizobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal en plantas de tomate.

En los 26 aislamientos evaluados no se evidenció fermentación de lactosa en el medio, la lectura de fluorescencia fue realizada bajo cámara UV. Se seleccionaron 15 aislamientos para evaluar la promoción de crecimiento. El parámetro de selección fue la producción de AIA donde se tomó la media y alta producción de este. Respecto a la coloración de Gram, se observó que todos los aislamientos son Gram negativos (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de aislamientos obtenidos de suelo rizosférico a 42 y 30°C, ácido indolacético (AIA) y fluorescencia.

Aislamiento (42°C)	AIA	Fluorescencia	Aislamiento (30°C)	AIA	Fluorescencia
LZ2	+++	(-)	LZ22	+	(+)
LZ3	++	(-)	LZ25	(-)	(-)
LZ4	+++	(-)	LZ27	(-)	(-)
LZ5	++	(-)	LZ28	(-)	(+)
LZ6	++	(-)	LZ29	+++	(+)
LZ7	++	(-)	LZ30	+++	(+)
LZ10	+++	(-)	LZ54	(-)	(-)
LZ15	+	(-)	LZ57	(-)	(-)
LZ33	(-)	(+)	LZ59	+++	(-)
LZ38	++	(-)	LZ60	++	(-)
LZ40	+	(-)	LZ61	++	(-)
LZ50	+	(-)	LZ62	++	(-)
LZ33C	+	(-)	LZ63	++	(-)

(-): Negativo, (+) Positivo; + baja producción, ++ media producción, +++ alta producción, respecto a la producción de color generada al momento de aplicar reactivo de Salkowski.

En el ensayo de promoción de crecimiento se evaluaron 15 rizobacterias, junto con un control negativo, que para este caso es la plántula sin inóculo. Los aislamientos se sometieron a un ensayo para seleccionar los que presentaron mayor promoción de crecimiento en las plántulas de tomate.

Los 15 aislamientos aumentaron el peso seco en raíz, 9 en vástago y 14 en el peso seco total (Tabla 2). Con respecto al incremento de peso seco de raíz, trece aislamientos incrementaron más del 200%, dos aislamientos en un rango entre 150-200%. En el incremento de peso seco de vástago, nueve aislamientos en un rango entre 0-50%, seis aislamientos estuvieron por debajo del control negativo. En el peso seco total, dos aislamientos incrementaron entre el 50-100%, doce de 0-50%. El tratamiento LZ63 estuvo por debajo del control negativo con -12%. Se seleccionaron ocho aislamientos, que presentaron mayor incremento en peso seco raíz respecto al control negativo (LZ59, LZ29, LZ38, LZ30, LZ10, LZ60, LZ7 y LZ6).

Tabla 2. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la longitud, peso seco de raíz, vástago y total en plántulas de tomate.

Aislamientos	Longitud (mg)	Peso seco raíz (mg)	Peso seco Vástago (mg)	Peso seco Total (mg)
LZ59	15.33 (12.7%) cba	3.99 (749%) a	7.12 (11%) dcb	11.11 (62%) a
LZ4	16.05 (18.04%) a	1.85 (294%) fed	9.21 (44%) a	11.06 (61%) a
LZ29	14.45 (6.25%) fedcb	2.82 (499%) cb	6.68 (4%) dcb	9.5 (38%) ba
LZ38	13.81 (1.54%) fed	3.38 (619%) ba	5.99 (-6%) edc	9.37 (36%) ba
LZ6	14.07 (3.48%) fed	2.15 (356%) edc	7.21 (13%) dcb	9.35 (36%) ba
LZ3	14.96 (9.99%) dcba	1.29 (175%) gf	7.91 (24%) ba	9.2 (34%) ba
LZ2	14.81 (8.88%) edcb	1.76 (275%) fe	7.31 (14%) cb	9.07 (32%) ba
LZ61	15.63 (14.93%) ba	1.64 (249%) fe	7.38 (15%) cb	9.02 (31%) cba
LZ30	14.36 (5.57%) fedc	2.55 (443%) dcb	6.31 (-1%) edcb	8.86 (29%) cb
LZ7	13.89 (2.14%) fed	2.28 (386%) edc	6.57 (3%) dcb	8.85 (29%) cb
LZ10	13.59 (-0.06%) f	2.06 (338%) fedc	6.2 (-3%) edc	8.26 (20%) dcb
LZ5	14.61 (7.41%) fedcb	1.62 (244%) fe	6.56 (3%) dcb	8.18 (19%) dcb
LZ62	13.78 (1.35%) fed	1.8 (283%) fed	6.29 (-2%) edcb	8.09 (18%) dcb
LZ60	13.4 (-1.47%) f	2.07 (341%) fedc	5.56 (-13%) ed	7.64 (11%) dcb
C (-)	13.6 (0%) f	0.47 (0%) g	6.4 (0%) edcb	6.87 (0%) dc
LZ63	13.78 (1.31%) fed	1.41 (200%) fe	4.67 (-27%) e	6.08 (-12%) d

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, LSD: comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas. C (-) Control negativo, plántulas sin inocular.

Objetivo 2. Determinar el crecimiento de plantas de tomate al ser inoculadas y sometidas a estrés de sequía e inundación, con y sin rizobacterias.

En estos ensayos, las plántulas de tomate fueron sometidas a estrés hídrico para seleccionar las cepas que presentaban mayor mitigación ante la sequía e inundación. Se evidenció que 11 aislamientos generaron aumento de peso seco en raíz, 10 en vástago y 11 en el peso seco total; lo que corresponde a: 73.3%, 66.6% y 73.3% respectivamente (Tabla 3). Con respecto al incremento de peso seco de raíz, tres aislamientos estuvieron en un rango entre el 100-150%, dos entre el 50-100%, seis de 0-50% y cuatro por debajo del control negativo. En el incremento de peso seco de vástago, dos aislamientos incrementaron más del 100%, dos entre 50-100% y seis entre el 0-50% y cinco por debajo del control negativo. En el peso seco total, un aislamiento estuvo por encima del 200%, uno entre 100-150%, dos entre el 50-100%, siete de 0-50% y cuatro por debajo del control negativo. Solo fueron seleccionados cinco aislamientos LZ5, LZ7, LZ62 y LZ63, que presentaron un valor significativo en el peso seco de raíz en comparación con el control negativo.

Tabla 3. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la longitud, peso seco de raíz, vástago y total frente al estrés por sequía en plántulas de tomate.

Aislamientos	Longitud (mg)	Peso seco raíz (mg)	Peso seco Vástago (mg)	Peso seco Total (mg)
LZ6	18.4 (29%) a	9.1 (142.6%) a	55.28 (299.1%) a	64.38 (265.8%) a
LZ7	17.3 (21%) ba	7.84 (109.0%) ab	23.52 (69.8%) bc	31.36 (78.18%) cb
LZ62	17.26 (21%) ba	7.72 (105.8%) ab	17.66 (27.5%) bcd	25.38 (44.2%) dc
LZ63	15.96 (12%) dcb	5.9 (57.3%) abc	17.86 (28.9%) bcd	23.76 (35%) dc
LZ5	16.77 (18%) cba	5.72 (52.5%) abc	36.23 (161.5%) b	41.95 (138.3%) b
LZ29	18 (26%) a	5.58 (48.8%) abc	13.92 (0.5%) de	19.5 (10.8%) dc
LZ60	16.64 (17%) cba	5.44 (45.0%) abc	11.22 (-18.9%) e	16.66 (-5.3%) d
LZ61	18.2 (28%) a	5.06 (34.9%) bcd	14.94 (7.8%) de	20 (13.6%) dc
LZ10	17.5 (23%) ba	5.05 (34.6%) abcd	16.8 (21.3%) cde	21.85 (24.1%) dc
LZ38	17.82 (25%) a	4.97 (32.5%) abc	14.18 (2.3%) de	19.15 (8.8%) dc
LZ3	18.45 (29%) a	4.93 (31.4%) bcd	13.12 (-5.2%) de	18.05 (2.5%) d
C (-)	14.25 (0%) d	3.75 (0%) cd	13.85 (0%) de	17.6 (0%) dc
LZ4	17.76 (25%) ba	3.58 (-4.5%) d	22.86 (65.0%) bc	26.44 (50.2%) dc
LZ59	17.72 (24%) ba	3.38 (-9.8%) d	12.93 (-6.6%) de	16.32 (-7.2%) d
LZ2	14.96 (5%) dc	3.2 (-14.6%) d	13.34 (-3.6%) de	16.54 (-6.02%) d
LZ30	16.93 (19%) cba	2.2 (-41.3%) d	13.5 (-2.5%) de	15.7 (-10.8%) d

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, LSD: comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, C (-) Control negativo, plántulas sin inocular.

Se evidencio que 12 aislamientos generaron aumento de peso seco en raíz, 10 en vástago y 11 en el peso seco total (Tabla 4). Con respecto al incremento de peso seco de raíz, tres aislamientos en un rango entre el 50-100% y nueve de 0-50% y tres por debajo del control negativo. En el incremento de peso seco de vástago, un aislamiento incremento más del 50%, diez aislamientos entre 0-50% cuatro aislamientos estuvieron por debajo del control negativo con un -1 a -25%. En el peso seco total, un aislamiento incremento más del 50%, once aislamientos incrementaron entre 0-50%. Tres aislamientos estuvieron por debajo del control negativo. Se seleccionaron cinco aislamientos LZ38, LZ2, LZ3, LZ4 y LZ5, estos mostraron mayor aumento en la biomasa de raíz.

Tabla 4. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la longitud, peso seco de raíz, vástago y total frente al estrés por inundación en plántulas de tomate

Aislamientos	Longitud (mg)	Peso seco raíz (mg)	Peso seco Vástago (mg)	Peso seco Total (mg)
LZ38	17.25 (24%)	5.65 (78%) a	12.78 (36%)	18.43 (47%)
LZ2	15.67 (12%)	5.6 (76%) a	12.06 (29%)	17.66 (40%)
LZ3	15.16 (9%)	5.03 (58%) ba	10.03 (7%)	15.05 (20%)
LZ4	15.6 (12%)	4.78 (50%) ba	14.3 (52%)	19.08 (52%)
LZ5	14.83 (6%)	4.48 (41%) cba	11.58 (23%)	16.05 (28%)
LZ7	15.64 (12%)	4.42 (39%) cba	9.37 (0%)	12.53 (0%)
LZ61	17 (22%)	4.4 (38%) cba	9.78 (4%)	14.18 (13%)
LZ6	14 (0%)	4.38 (38%) cba	10.22 (9%)	14.6 (16%)
LZ63	16.28 (17%)	4.25 (34%) dcba	11.7 (25%)	15.95 (27%)
LZ62	17 (22%)	4.05 (27%) dcba	11.05 (18%)	15.1 (20%)
LZ59	16.48 (18%)	3.83 (20%) dcba	9.27 (-1%)	13.1 (4%)
LZ29	15.63 (12%)	3.45 (8%) dcb	10.12 (8%)	13.57 (8%)
C (-)	13.95 (0%)	3.18 (0%) dcb	9.38 (0%)	12.57 (0%)
LZ30	15.98 (15%)	2.95 (-7%) dcb	8.63 (-8%)	11.58 (-8%)
LZ10	15.72 (13%)	2.4 (-25%) dc	7.96 (-15%)	10.36 (-18%)
LZ60	13.8 (-1%)	2.32 (-27%) d	7.02 (-25%)	9.33 (-26%)

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, LSD: método de comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas (la diferencia entre la media de los aislamientos no será significativa si los respectivos intervalos LSD se sobreponen), C (-) Control negativo, plántulas sin inocular.

Objetivo 3. Evaluar la actividad enzimática en suelos con y sin estrés hídrico, enriquecido con rizobacterias y sin ellas.

El aislamiento LZ30 presentó la mayor actividad arilsulfatasa con un 80,39% (Figura 2), seguido de los aislamientos LZ10 y LZ59 con una concentración del 74,51% y 61,08% respectivamente. Los aislamientos LZ60 y LZ7 presentaron los más bajos valores para el suelo inoculado.

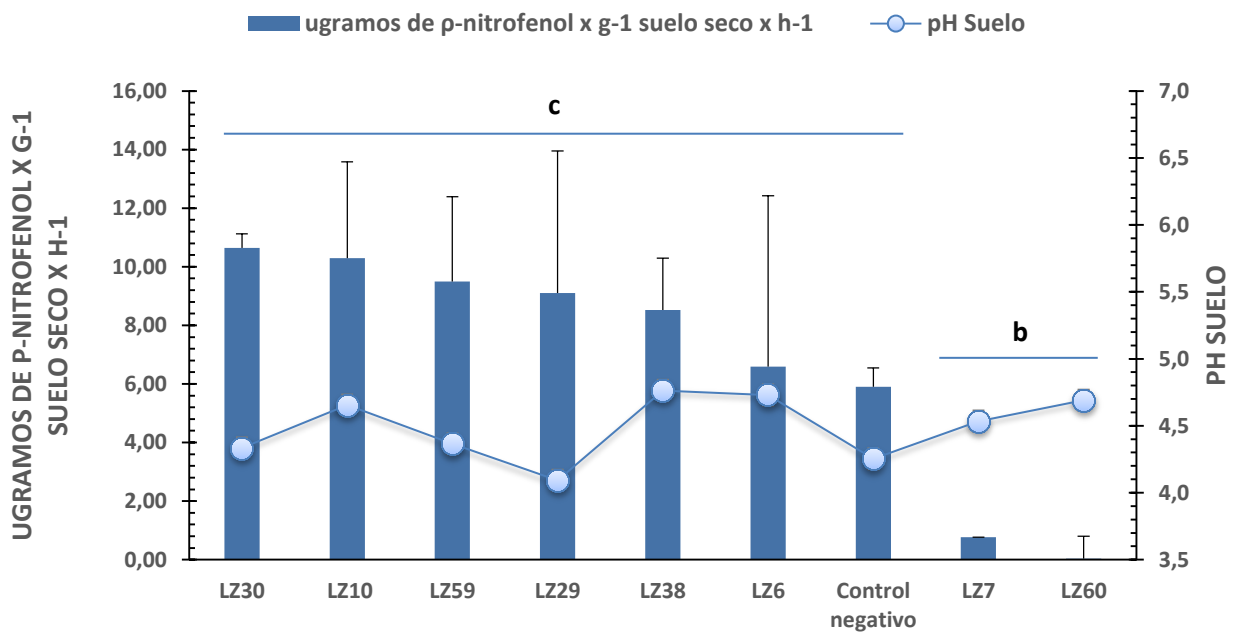


Figura 2. Actividad enzimática de Arilsulfatasa para aislamientos seleccionados del ensayo de promoción de crecimiento.

Respecto a la actividad de fosfatasa ácida (Figura 3), no se observa diferencia significativa entre los aislamientos comparándolos con el control negativo. Sin embargo, el aislamiento LZ10 muestra una actividad enzimática superior, con un 32,04%.

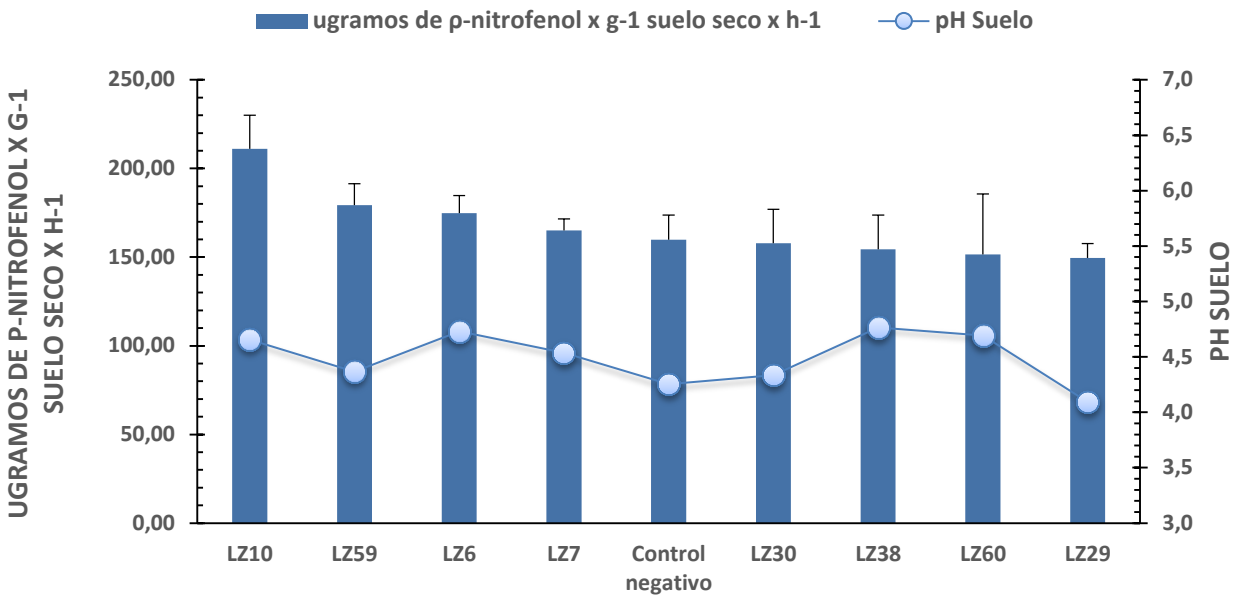


Figura 3. Actividad enzimática de Fosfatasa ácida para aislamientos seleccionados del ensayo de promoción de crecimiento.

Todos los aislamientos presentaron mayor actividad fosfatasa alcalina con respecto al control negativo (Figura 4). Los aislamientos LZ10 y LZ27 presentaron la mayor actividad fosfatasa alcalina con incrementos del 340,13% y 236,91% con respecto al control, respectivamente. El aislamiento LZ6 presento la menor actividad enzimática (43,09%).

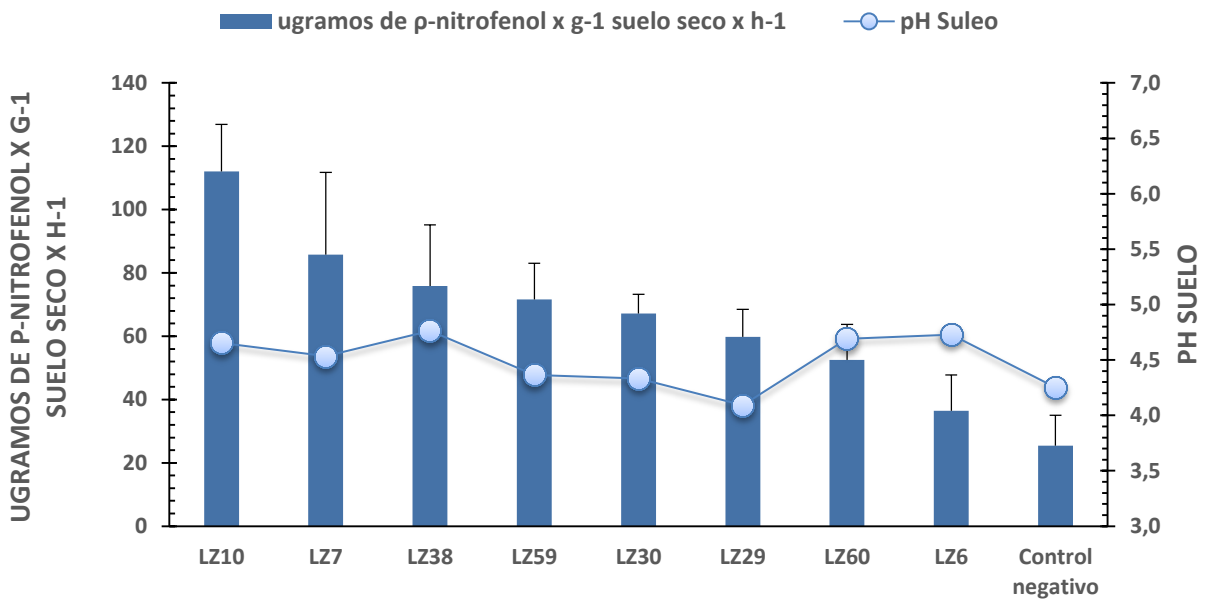


Figura 4. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina para aislamientos seleccionados del ensayo de promoción de crecimiento.

Respecto a la actividad enzimática de fosfatasa acida para los aislamientos seleccionados del ensayo de estrés por sequía (Figura 5), es posible evidenciar que hay diferencia entre todos los aislamientos respecto al control negativo, mostrando una mayor concentración de ugramos de p-nitrofenol hasta 309% para el caso de LZ6, los demás aislamientos se encuentran entre 100% y 250% superiores al control negativo.

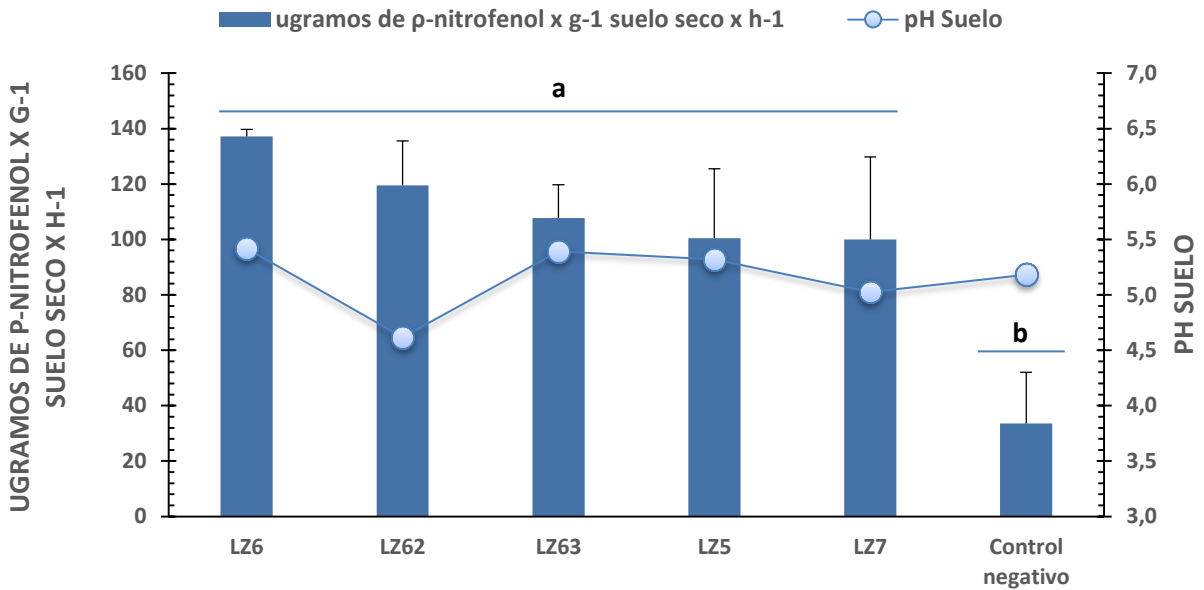


Figura 5. Actividad enzimática de fosfatasa ácida para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en sequía.

Los aislamientos seleccionados en el bioensayo de estrés por inundación (Figura 6) presentaron aumentos significativos de la actividad enzimática de fosfatasa ácida respecto al control negativo. El aislamiento LZ4 mostró la mayor actividad (284,63%), seguido de LZ38 con 268,29% y LZ2 con 222,36%. Los dos aislamientos restantes presentaron actividad por encima del 100% con respecto al control negativo.

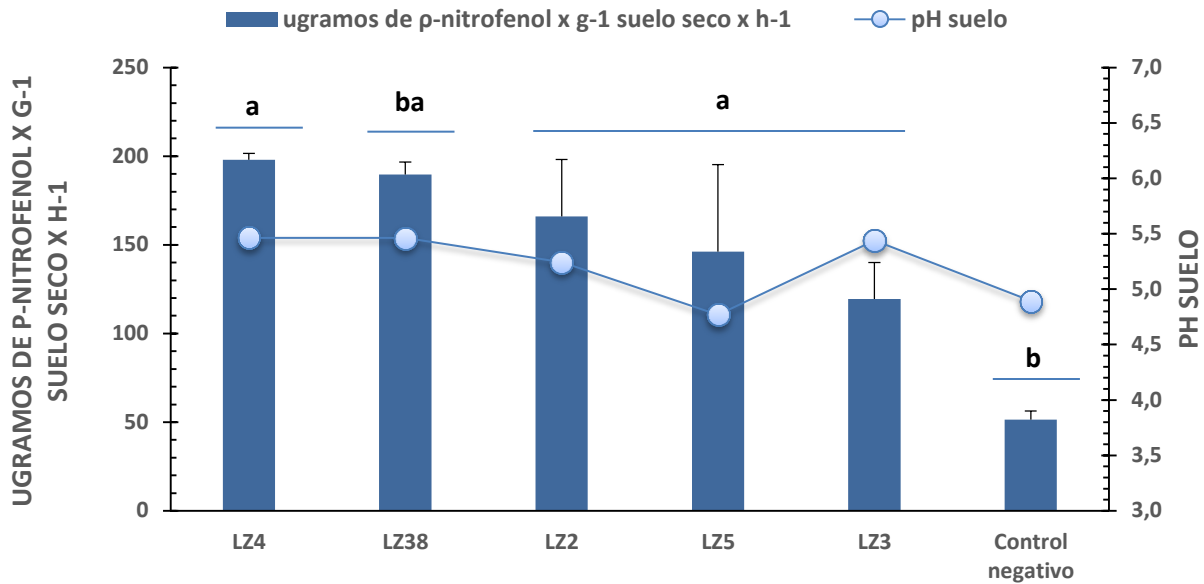


Figura 6. Actividad enzimática de fosfatasa ácida para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en inundación.

Respecto al bioensayo del estrés por sequía, cuatro de los cinco aislamientos presentaron actividad fosfatasa alcalina superior al control negativo, siendo LZ6 el de mayor actividad (247,96%). Los aislamientos LZ62 y LZ63, presentan concentraciones superiores al 130%. Mientras los aislamientos LZ5 y LZ7 presentaron baja actividad (Figura 7).

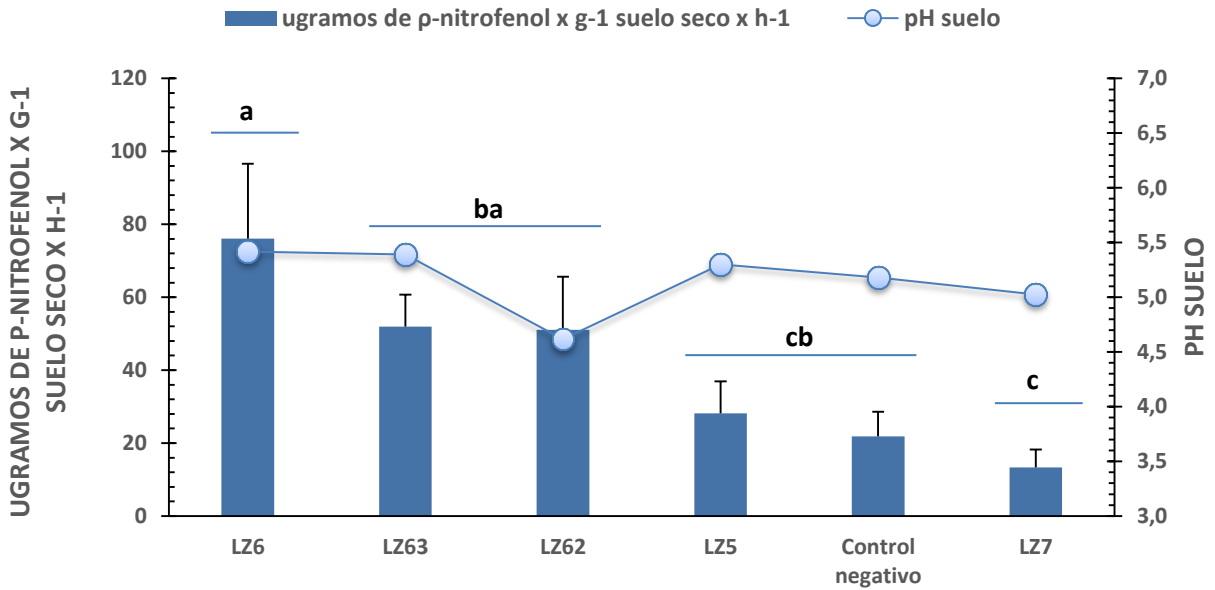


Figura 7. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en sequía.

En el bioensayo de estrés por inundación, el aislamiento LZ5 presento la mayor actividad (345,19%) fosfatasa alcalina (Figura 8), seguido de LZ38, LZ4 y LZ2, con incrementos superiores al 200% y LZ3 con 147,35%.

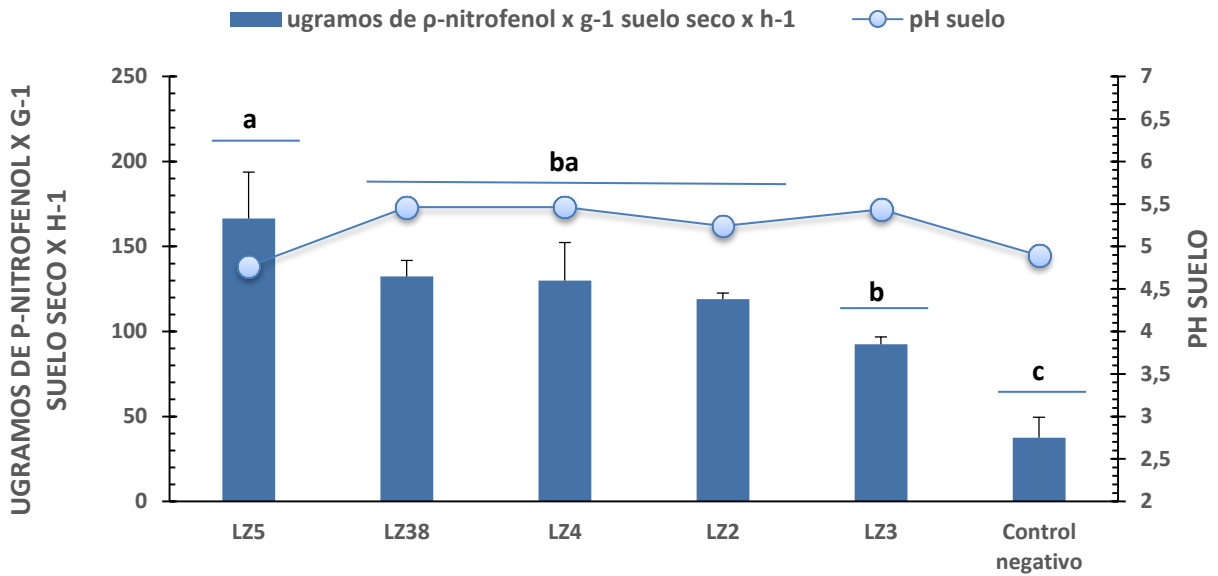


Figura 8. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina para aislamientos seleccionados del ensayo de mitigación de estrés hídrico en inundación.

La actividad enzimática de los quince aislamientos fue medida como parámetro de control. Para el caso de fosfatasa alcalina (Figura 9) no se encuentra diferencia entre la mayoría de los aislamientos. Sin embargo, es posible ver una mayor actividad en los aislamientos LZ63 y LZ29, dichos aislamientos mostraron mayor actividad en los bioensayos analizados anteriormente.

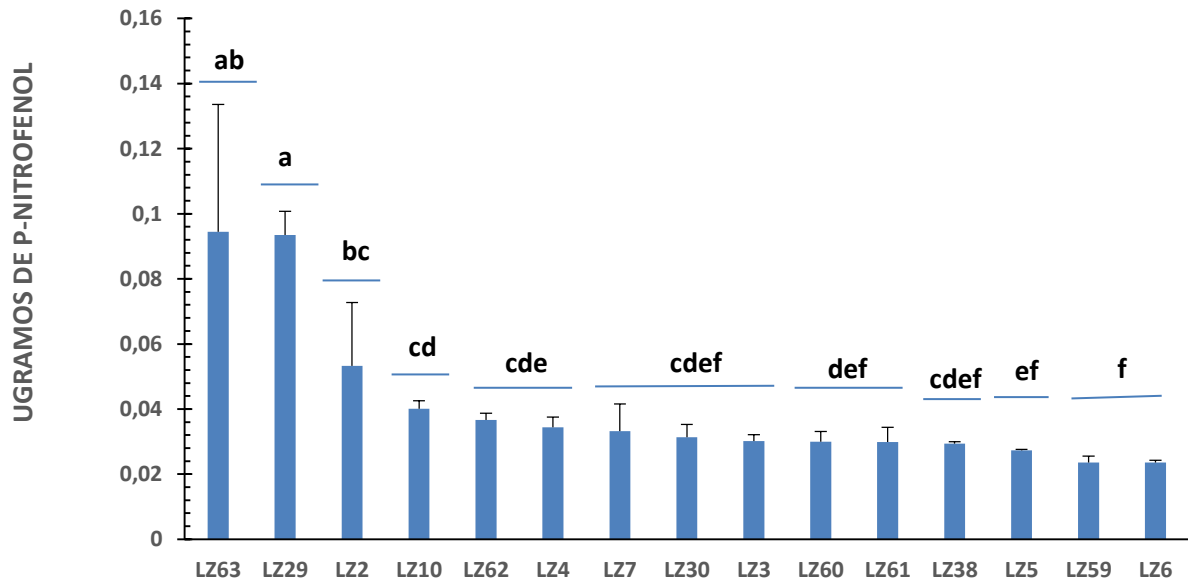


Figura 9. Actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina para los aislamientos de papa.

Los aislamientos LZ5, LZ4, LZ61, LZ60, LZ7 y LZ6 presentaron la mayor actividad enzimática de fosfatasa ácida (Figura 10). Estos aislamientos también mostraron una óptima actividad enzimática en los bioensayos analizados anteriormente.

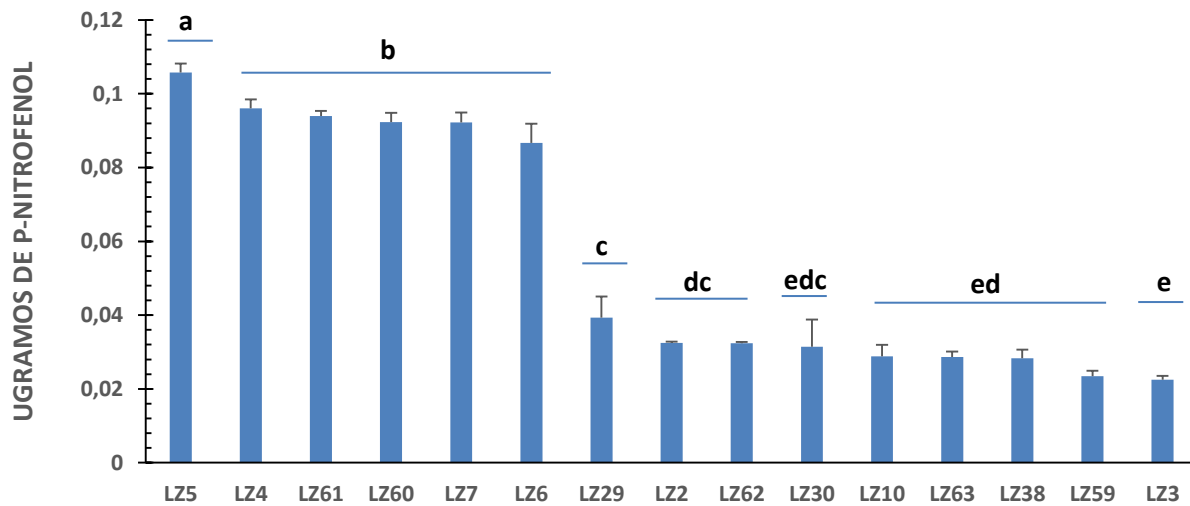


Figura 10. Actividad enzimática de Fosfatasa Ácida para los aislamientos trabajados.

5. Discusión.

Las rizobacterias son uno de los grupos de bacterias promotoras de crecimiento vegetal más estudiados, se encuentran asociadas a muchas especies de plantas, ya que pueden colonizar la superficie de las raíces y la interfaz del suelo estrechamente adherida³⁴. Estas rizobacterias son más utilizadas en la industria agrícola, debido a su alta eficiencia como biofertilizantes, bajo costo y ausencia de alteraciones en el medio ambiente tanto en la flora como en la fauna³⁵.

Se evaluaron 15 rizobacterias aisladas de suelo rizosférico de papa, todos los aislamientos fueron evaluados para la promoción de crecimiento en plántulas de tomate. En este ensayo, las rizobacterias tuvieron efecto positivo como PGPR (Rizobacteria promotora de crecimiento vegetal), 13 de las 15 rizobacterias mostraron un aumento en la longitud total, 14 en el peso seco de la raíz y 9 en el peso seco del vástago respecto al control negativo. El 53% de los aislamientos mostraron un incremento de las variables mayor al 30%, respecto al control negativo en el peso total de plántulas de tomate. La promoción de crecimiento por rizobacterias aisladas de papa ha sido reportada en trabajos como el de Kesaulya et al³⁶ quienes evaluaron 70 aislamientos de suelo rizosférico de papa crecida a una altitud de 700 m sobre el nivel del mar en la isla Buru-Maluku, 36 de estos aislamientos fueron capaces de producir solubilización de AIA, sideróforos y fosfatos. Los 36 aislamientos presentaron actividad bioestimulante, biofertilizante y bioprotector³⁶. Dawwam et al³⁷ analizaron la promoción de crecimiento vegetal de ocho rizobacterias de papa, en donde, todos los aislamientos produjeron AIA y cuatro solubilizaron fosfatos. Aquellos aislamientos con mayor actividad para AIA y solubilización de fosfatos mostraron diferencias significativas en promoción de papa respecto al control negativo. Mediante análisis de secuenciación de ADN ribosomal 16S se identificaron como *Bacillus cereus*³⁷.

Desde el punto de vista ecológico y de biofertilizantes en la agricultura, es importante resaltar la importancia de la diversidad microbiana en los agroecosistema y en la rizosfera de los cultivos. Son pocas las rizobacterias que se conocen como promotoras de crecimiento vegetal y su uso en la industria es limitado³⁸, Majeed et al³⁹ caracterizaron nueve rizobacterias de trigo, de las cuales siete pudieron producir AIA y fijaron nitrógeno y cuatro pudieron solubilizar fosfatos. Las

rizobacterias fueron identificadas como *Stenotrophomonas spp*, *Acetobacter pasteurianus* y *Stenotrophomonas metálico* por medio de secuenciación del gen 16S rRNA³⁹.

Los aislamientos mitigaron el efecto del estrés de sequía al aumentar el peso seco de raíz (11 aislamientos), vástago (10 aislamientos) y total (11 aislamientos) respecto al control negativo. Ullah et al⁴⁰ evaluaron silicio y PGPR para mejorar la tolerancia a la sequía en plantas de tomate bajo condiciones de campo. Ellos encontraron ambos niveles de sequía (45% y 35%) causaron una reducción significativa en el crecimiento y rendimiento de las plantas. Sin embargo, la inoculación con PGPR incremento la acumulación de K⁺ en la planta y el contenido relativo de agua, mientras que redujo la absorción de Na⁺ y fuga de electrolitos, y mejoró el rendimiento en un 18,34%. Los efectos de mejora de Si y PGPR fueron en su mayoría más pronunciados en la sequía al 35% en comparación con la sequía al 45%. Las PGPR fueron más efectivas para aliviar efectos del estrés por sequía⁴⁰. Abril et al⁴¹ evaluaron el efecto de la inoculación con *Bacillus* y *Azotobacter* sobre desarrollo de pasto guinea *Megathyrus maximus* en condiciones de sequía y riego controlado. La inoculación con *Bacillus* aumentó la concentración de nitrógeno foliar, la turgencia, la longitud de las raíces y altura de la planta en relación con el testigo con sequía y sin inoculación. La inoculación con *Azotobacter* promovió el crecimiento de *M. maximus*. La inoculación individual y co-inoculación de *Azotobacter* y *Bacillus* contrarrestaron los efectos negativos del estrés hídrico⁴¹.

Los aislamientos tuvieron efecto positivo frente al estrés por inundación ya que aumentaron el peso seco de la raíz (100%), vástago (60%) y total (93.3%) respecto al control negativo. Kim et al⁴² evaluaron la rizobacterias *Klebsiella variicola* AY-13, productora de AIA (84.27 ± 3.55 µg/mL) en plantas de soya bajo inundación, esta cepa mitigó el estrés de inundación. Igualmente, mejoró significativamente el crecimiento de las plantas, contenidos de clorofila, y la eficiencia cuántica de la clorofila durante y después de la inundación⁴². Ali et al⁴³ analizaron la estructura y la función de la ACC desaminasa en PGPR para mitigar el estrés por inundación. Ellos encontraron que estas bacterias (*Pseudomonas sp.UW4*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Serratia ureilytica*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Ochrobactrum rhizosphaerae*) disminuyen el nivel de estrés del etileno en las plantas sometidas a inundación⁴³.

Comprender las actividades biológicas y bioquímicas del suelo, así como la actividad enzimática del mismo, es importante para diseñar alternativas de modificación y mejoramiento de sus condiciones⁴⁴. La investigación permitió evaluar la actividad enzimática del suelo luego de los ensayos de promoción de crecimiento, encontrando que todos los aislamientos presentaron actividad fosfatasa alcalina muy superior al control negativo. Mientras el 50% de los aislamientos presentaron actividad fosfatasa ácida, el 75% mostraron actividad arilsulfatasa superior a la registrada en el control negativo (Suelo sin inocular). La actividad enzimática es una medida de la calidad del suelo para su producción agrícola y así mismo se relaciona con la calidad ambiental del mismo⁴⁵. Santos et al⁴⁶ relacionaron la diversidad y actividad enzimática de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y *Fusarium* en suelos de cultivo de soja con la productividad. Las muestras de suelo de alto rendimiento tuvieron concentraciones más altas de *Bacillus* y bacterias totales; en el suelo de bajo rendimiento se encontró mayor concentración de *Fusarium*. Las actividades enzimáticas, B-glucosidasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa, se encontraron en valores más bajos en muestras de suelo de alto rendimiento, debido a las condiciones y los atributos químicos estudiados en el suelo y diferían estadísticamente del campo de bajo rendimiento, que presentaba mejores actividades enzimáticas. Por lo tanto, concluyen que las mejores actividades para fosfatasas están mediadas por acción de la Ureasa mientras que las bajas actividades se atribuyen a las concentraciones de altas de Manganeso. Sin embargo, en las muestras de la rizosfera, estas enzimas tuvieron una mayor actividad en el campo de alto rendimiento⁴⁶. Moreno et al⁴⁷ evaluaron dos suelos de la rizosfera de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y suelo circundante en cuatro períodos de cultivo: siembra, floración, cosecha y postcosecha. La fosfatasa ácida aumentó a medida que avanzaba la temporada de cultivo, pero no mostraron diferencias significativas. Mientras que la fosfatasa alcalina mostró diferencias entre los dos tipos de suelos, lo que puede atribuirse a las características de ambos suelos y el mineral dominante en cada uno de ellos. De igual forma, los pastos de estas plantas no se encuentran expuestos a labranza mecánica, que permite la acumulación de exudados y materia orgánica. En el estudio, el cultivo de amaranto se estableció con la labranza mínima, lo que favorece el crecimiento microbiano y actividad enzimática potencial en el suelo suelto ubicado cerca de la zona de la raíz principal⁴⁷.

Para el presente estudio, la fosfatasa ácida muestra una actividad enzimática superior en el 100% de los aislamientos, tanto para el estrés por sequía como por inundación respecto al control negativo, siendo hasta 200% superior a las concentraciones de p-nitrofenol registradas por el suelo sin inóculo. Teniendo presente que el suelo utilizado para todos los bioensayos es un suelo con pH ácido, como se evidencia en cada una de las figuras, fue posible encontrar mayor cantidad de aislamientos con mayor concentración de p-nitrofenol para fosfatasa ácida, lo que permite ver optimizada la actividad de esta enzima. Sin embargo, la fosfatasa alcalina muestra una actividad enzimática superior al suelo sin inóculo en todos los aislamientos seleccionados en el estrés por inundación, hasta 300% superior al mismo, mientras que para los aislamientos de estrés por sequía se muestra que el 80% de los aislamientos fueron superiores hasta en 200% respecto al suelo sin inóculo, lo que establece una buena relación entre las características del suelo y lo beneficioso del inóculo para las plantas de este ensayo, por lo que es posible determinar un gran potencial en los aislamientos para la mitigación del estrés hídrico.

Los aislamientos LZ5, LZ4, LZ61, LZ60, LZ7 y LZ6 mostraron las concentraciones más altas para fosfatasa ácida, mientras que para fosfatasa alcalina solo tres aislamientos LZ63, LZ29 y LZ2 mostraron concentraciones superiores respecto a los demás. Behera et al⁴⁹, determinaron que actividad de fosfatasa ácida en una *Serratia* sp solubilizadora de fosfato dependía de las condiciones de cultivo. La actividad óptima de la fosfatasa ácida fue a las 48 horas de incubación a una temperatura de 45°C y una agitación de 100 rpm, pH 5, con glucosa como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno⁴⁹. Henao et al⁵⁰, midió la actividad enzimática de fosfatasa ácida y alcalina en aislamientos solubilizadoras de fosfato mediante la técnica de p-nitrofenil fosfato con curvas de crecimiento determinando la actividad por unidades formadoras de colonia (UFC) en donde la actividad inicio con 2,28 UFC alcanzando su valor a las 15 horas con una producción máxima de 8.40 UFC⁵⁰. Cepas de las especies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Serratia marcescens* y *Pantoea* dispersa con elevados niveles de eficiencia en la solubilización⁵¹. Plazas⁵², midió en bacterias solubilizadoras de fosfato la actividad enzimática de fosfatasa ácida y alcalina en donde el resultado más alto de la actividad fue medida a la hora 54 con 73,3 UFC para la bacteria *Enterobacter agglomerans*⁵².

6. Conclusiones.

Los aislamientos LZ59, LZ4, LZ29, LZ6, LZ3, LZ2, LZ61, LZ7, LZ5 promovieron el crecimiento en las plántulas de tomate, LZ59 presentó 749% en incremento porcentual relativo respecto al control negativo en peso seco de raíz como parámetro de selección. Se determinó que el 80% de los aislamientos mitigaron el estrés de sequía e inundación en los parámetros de crecimiento. Sin embargo, el aislamiento LZ6 presentó estadísticamente más incremento porcentual relativo con respecto al control negativo en comparación a los demás en la mitigación de estrés por sequía y el aislamiento LZ38 en inundación, en este sentido, LZ6 y LZ38 muestran un gran potencial para ser utilizados en la industria agrícola y resolver problemáticas actuales de nuestro país teniendo en cuenta el hecho de que cada vez nos enfrentamos a episodios climáticos más drásticos en cada una de las regiones.

Por otra parte, LZ30 presentó la mayor actividad arilsulfatasa con 80,39% para el ensayo de promoción de crecimiento. LZ27, LZ10, LZ6 y LZ5 mostraron mejor actividad fosfatasa alcalina para los ensayos de promoción de crecimiento, sequía e inundación, mientras LZ10, LZ6 Y LZ4 presentan los mejores resultados para fosfatasa acida respecto a los mismos ensayos.

Este estudio permitió determinar que las plantas de tomate variedad Rio grande sembradas bajo condiciones de invernadero en la ciudad de Bogotá que fueron inoculadas con aislamientos bacterianos y sometidas a estrés hídrico presentaron resultados favorables con respecto a su crecimiento teniendo en cuenta los parámetros evaluados y mostrando mejores características físicas en comparación con aquellas plantas que no fueron inoculadas. Aquellas plantas que fueron inoculadas, pero no se sometieron a estrés hídrico igualmente mostraron resultados favorables para el desarrollo de cada uno de los parámetros evaluados, comparados frente al control negativo. Por esta razón, los aislamientos que generaron mejor respuesta frente a cada ensayo pueden brindar al agricultor alternativas que le permitan tener mayor rentabilidad de sus cultivos y menos efectos negativos al ambiente, de igual forma estos pueden ser utilizados en la misma línea investigativa en trabajos del laboratorio de investigación de la Universidad Antonio Nariño.

Referencias bibliográficas.

- 1 Contexto ganadero [Internet]. Bogotá. 2015 oct 8. [consultado 2018 May 03]. Disponible en: <http://www.contextoganadero.com/agricultura/sequia-afecta-7-regiones-y-mas-de-15-mil-productores-de-colombia>
- 2 Ocampo O. El cambio climático y su impacto en el agro. Revista de ingeniería. Universidad de los Andes [Internet]. 2011 [citado 03 May 2018]; 33 115-123. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ring/n33/n33a12.pdf>
- 3 Ramos F, Galatro A, Simontacchi M. Eficacia en el uso y adquisición de fosforo en plantas cultivadas: participación del óxido nítrico. Investigación Joven [internet]. 2015 Jun; 2(1) [citado 2018 Mar 25]. Disponible en: <http://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/2123>
- 4 Zahir Z.A, Arshad M, Frankenberger WT. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives In Agriculture. Advances in Agronomy [internet]. 2003; 81(97-168) [citado 2018 Mar 25]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211303810039>
- 5 Armada E, Roldán A, Azcon R. Differential activity of autochthonous bacteria in controlling drought stress in native Lavandula and Salvia plants species under drought conditions in natural arid soil. Microb Ecol [internet]. 2014 Feb; 67(2) [citado 2018 Mar 30]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24337805>
- 6 DANE. Boletín mensual INSUMOS Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA 20. Producción limpia de hortalizas, una mejor salud y bienestar. 2014 [Internet]. [actualizado abr 2014]. [citado 02 abril 2018]. Disponible en https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_feb_2014.pdf

- 7 Felice VD, Mancinelli R, Proulx R, Campiglia E. A multivariate analysis for evaluating the environmental and economical aspects of agroecosystem sustainability in central Italy. *Journal of environmental management* [Internet]. 2012 [citado 02 abril 2018]; 98:119-126. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479711004464>
- 8 Lopez M, Martinez VR, Brossard M, Pereira H. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. [Internet]. *Agronomía Tropical*. 2008. Vol. 58(4): 391-401.
- 9 Baudron F, Giller KE. Agriculture and nature: Trouble and strife?. *Biological Conservation* [Internet]. 2014 [citado 02 abril 2018]; 170:232-245. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006320713004308>
- 10 Gómez BE, Hernández A, Hernán C, Arroyo G, Vargas L, Olalde V. Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai* [Internet]. 2012 [citado 28 Abr 2018]; 8(3): 97-102. Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/53765/47864>
- 11 Angulo V, Sanfuentes E, Rodríguez F, Sossa K. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2014 [citado 28 Abr 2018]; 46(4): 338-347. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754114700938>
- 12 Santillana N, Arellano C, Zúñiga D. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum miller*). Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina. Departamento Académico de Biología [Internet] 2005. [citado 28 Abr 2018]; 4(1,2). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v4n1-2/a07v4n1-2.pdf>
- 13 Cedeño DA, Canchignia HF, Cruz NJ, Guerra FF, Gaibor RR, Cedeño AV. Rizobacterias que promueven el desarrollo e incremento en productividad de *Glycine max* L. *Cienc Tecn UTEQ* [Internet]. 2017 [citado 28 Abr 2018]; 10(1): 7-15. Disponible en:

<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/docview/2002966454/fulltextPDF/7F4D9E2713904FF3PQ/1?accountid=50438>

- 14 Pérez-Pazos JV, Sánchez-López DB. Characterization and effect of Azotobacter, Azospirillum and Pseudomonas associated with Ipomoea Batatas of Colombian Caribbean. Revista Colombiana de Biotecnología 2017;19(2):35-46. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/pqrl/docview/1999157955/7305606C55F14517PQ/2?accountid=50438>
- 15 Katherine CB, Colmenares A, Lilian Ramírez Caicedo, Laura MR, Diana Cárdenas Caro. Inoculación de Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) con Rizobacterias en Villa del Rosario, Norte de Santander / Inoculation of Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) with Rhizobacterias in Villa del Rosario, Norte de Santander. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 2015;68(1):7459-7470.
- 16 Murcia Linares AN, Cruz Bustos SF. Efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en Maracuyá y Badea cultivadas en condiciones de estrés hídrico. [Trabajo de grado para optar al título de biólogo]. Bogotá D.C: Universidad de la Salle. Departamento de ciencias básicas programa de biología; 2017.
- 17 Bécquer CJ, Puentes AB, Ávila U, Quintana M, Galdo Y, Medinilla F, et al. Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en triticale (*X. Triticosecale Wittmack*), en condiciones de estrés por sequía. Pastos y Forrajes [Internet]. 2016 [citado 28 Abr 2018]; 39(1): 19-26. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942016000100003
- 18 Abril A, Biasutti C, Maich R, Dubbini L, Noe L. Inoculación con Azospirillum spp. en la Región Semiárida-Central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. Cienc.suelo [Internet]. [citado 18 Sept 2018]; 24(1): 1-9. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672006000100002

- 19** Torres, M. V., & Lizarazo, L. M. (2006). Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). *Agronomía Colombiana*, 24(2), 317-325. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co/docview/1677587118?accountid=50438>
- 20** Isabel Cristina Yoshioka T, Sánchez dP, Martha Marina Bolaños B. Actividad de fosfatasas ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo. *Acta Agronómica* 2006;55(2):1-8. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/docview/1677586648/1263404A842C49DDPQ/1?accountid=50438>
- 21** Laura Emilia Cerón, R., & Ramírez, E., V. (2011). Microbial activity in soil and sediments of the upper arzobispo river basin. *Agronomía Colombiana*, 29(2), 257-263. Retrieved from <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co/docview/1677583076?accountid=50438>
- 22** Magda Narváez Castillo, Sánchez, d. P., & Menjívar Flores, J. C. (2010). Cambios en las propiedades químicas y en la actividad de las fosfatasas en suelos cultivados con maíz dulce (*zea mays* L.) fertilizados con vinaza. *Revista Facultad Nacional De Agronomía Medellín*, 63(2), 5533-5541. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co/docview/1677548007?accountid=50438>
- 23** Cámara de comercio de Bogotá [Internet]. Bogotá; 2013 [citado 28 agosto 2018]; Disponible en: <https://www.ccb.org.co/content/download/13926/176638/file/Tomate.pdf>
- 24** Vallejo Cabrera, Franco Alirio. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia [Internet]. [citado 02 Sept 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/46245/>
- 25** Curtis H, Barnes N, Schnek A, Flores G, Gandola L KR et al. *Biologia*. Bologna. Zanichelli. 2003.
- 26** La enciclopedia de ciencias y tecnologías en argentina, ECy-ar [Internet]. [citado 13 marzo

2019]; Disponible en: <https://cyt-ar.com.ar/cyt-ar/index.php/Rizobacteria>

- 27** Finagro [Internet]. Bogotá; [citado 28 Agosto 2018]; Disponible en: https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/info_sect/image/tomate_0.docx
- 28** Daniel Benjumedá Muñoz. Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones. Grado en Farmacia. Sevilla. Universidad de Sevilla; 2017. Disponible en: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MU%C3%91OZ%20C%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 29** Mendoza, Ma de las Nieves Rodríguez, San Miguel-Chávez, R., Cué, J., Luis Garc, & Mendoza, A. B. (2013). INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN EL CULTIVO DE MELÓN (cucumis melo). Interciencia, 38(12), 857-862. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co/docview/1503245325?accountid=50438>
- 30** Yepes A, Marcos SB. RESPUESTAS DE LAS PLANTAS ANTE LOS FACTORES AMBIENTALES DEL CAMBIO CLIMÁTICO GLOBAL: REVISIÓN. Colombia Forestal [Internet] 2011 Jul;14(2):213-232. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/docview/1808406864/9F8C41BE4AA4221PQ/1?accountid=50438>
- 31** Isabel Cristina Yoshioka T, Sánchez dP, Martha Marina Bolaños B. Actividad de fosfatasa ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo. Acta Agronómica [Internet] 2006;55(2):1-8. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/docview/1677586648/1263404A842C49DDPQ/1?accountid=50438>
- 32** Castillo G, Altuna B, Michelena G, Bravo J, Acosta M. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. Anales de Biología [Internet]; 2005; 27: 137-142 [citado mar 13 2019]. Disponible en: [https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2255/1/AB27%20\(2005\)%20p%20137-142.pdf](https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2255/1/AB27%20(2005)%20p%20137-142.pdf)

- 33** Sergio Calvo García. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. CT [Internet]. 201; 3 [citado Sep 21 2018] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3761553.pdf>
- 34** Stephane C, Brion D, Jerzy N, Christophe C, Essaid B. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospect, American society for microbiology [Internet].2005 [citado 02 Abr 2019];71: 4951-4959. Available from: <https://aem.asm.org/content/aem/71/9/4951.full.pdf>
- 35** YOAV BASHAN. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. Biotechnol Adv [Internet]. 1998; 16:1–42. Available from: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/inoculants.pd.f>
- 36** Henry K,Baharuddin,Bandron Z,Syatrianty AS. Isolation and Physiological Characterization of PGPR from Potato Plant Rhizosphere in Medium Land of Buru Island, Procedia Food Science[Internet].2015[citado 02 Abr 2019];3:190-199.Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X1500022X>
- 37** Ghada ED,Adel E,Hassan E,Abbas IH,Mohamed MH. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant, Annals of agricultural sciences [Internet].2013[citado 02 Abr 2019];58:195-201.Disponible <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178313000298#!>
- 38** Elein TA,Angel L,Annia H. Beneficial microorganisms as efficient biofertilisers fortomato crops (Lycopersicon esculentum, Mill), Rev. Colomb. Biotecnol [Internet].2005[citado 02 Abr 2019];7(2):47-54. Disponible <https://www.redalyc.org/html/776/77670207/>
- 39** Pavan KA,Shruti A. Characterization of Bacillus sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (Lycopersicon esculentum) for their use as potential plant growth

promoting rhizobacteria, Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci[Internet].2013 [citado 02 Abr 2019];2(10): 406-417. Disponible

https://www.researchgate.net/profile/Pavan_Agrawal4/publication/305490624_Characterization_of_Bacillus_sp_strains_isolated_from_rhizosphere_of_tomato_plants_Lycopersicon_esculentum_for_their_use_as_potential_plant_growth_promoting_Rhizobacteria/links/57913f5e08ae0831552f98d1.pdf

40. Ubaid U Muhammad A,, Sher MS, Ali RS. Growth behavior of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under drought stress in the presence of silicon and plant growth promoting rhizobacteria, Soil and Environment [Internet].2016[citado 02 Abr 2019];35(1):65-75. Disponible

https://www.researchgate.net/profile/Ali_Siddiqui12/publication/303722960_Growth_behavior_of_tomato_Solanum_lycopersicum_L_under_drought_stress_in_the_presence_of_silicon_and_plant_growth_promoting_rhizobacteria/links/574fad9608ae1880a8228b99.pdf

41 Abril JL, Roncallo B, Bonilla R. Effect of inoculation with bacteria of the genus bacillus on the growth of *Megathyrus maximus* Jacq, in conditions of water stress. Agron[Internet].2017[citado 03 Abr 2019];37(1) 25–37. Disponible <http://www.faz.unt.edu.ar/ranar/ranar37103.pdf>

42 Ah-Young K, Raheem S, Sang-Mo K, Chang-Woo S, Yeon-Gyeong P, Hyun-Jin P, et al. IAA-producing *Klebsiella variicola* AY13 Reprograms Soybean Growth During Flooding Stress. Journal of Crop Science and Biotechnology[Internet].2017[citado 02 Abr 2019];20(4) 235–242. Disponible <https://link.springer.com/article/10.1007/s12892-017-0041-0>

43 Sajid A, Won-Chan K. Plant Growth Promotion Under Water: Decrease of Waterlogging-Induced ACC and Ethylene Levels by ACC Deaminase-Producing Bacteria, Front

- Microbiol[Internet].2018[citado 02 Abr 2019];9.Disponible <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5981179/>
- 44** Santos MS,Villela ED,Pazianotto RA,Reyaldo EF,Silva EH,Bueno AC,May A. Evaluation of microbial and enzymatic communities in soil and rizosphere from soybean plants,AJOL[Internet].2018[citado 02 Abr 2019];26(1).Disponible <https://www.ajol.info/index.php/acsj/article/view/167528>
- 45** Xiangzhen L,Pariente S. Arylsulfatase activity of soil microbial biomass along a Mediterranean-arid transect, Soil Biology and Biochemistry [Internet].2003[citado 02 Abr 2019];35(7) 925-934.Disponible <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071703001433>
- 46** Santos MS,Villela ED,Pazianotto RA,Reyaldo EF,Silva EH,Bueno AC,May A. Evaluation of microbial and enzymatic communities in soil and rizosphere from soybean plants,AJOL[Internet].2018[citado 02 Abr 2019];26(1).Disponible <https://www.ajol.info/index.php/acsj/article/view/167528>
- 47** Moreno IP, Ferrara MJ, León GF, Rivera BF, Mayorga RL, Pérez NO. Enzymatic activity and culturable bacteria diversity in rhizosphere of amaranth, as indicators of crop phenological changes. Bot. sci [Internet]. 2018 [citado 2019 Abr 06] ;96(4): 640-649. Disponible.http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200742982018000400640&lng=es.
- 48** Piotrowska DA,Anetta SZ,Dariusz G,Jacek DA. Spatio-temporal variability of soil sulfur content and arylsulfatase activity at a conventionally managed arable field.Geoderma[Internet].2017[citado 2019 Abr 06] ;295:107-118. Disponible <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706117302318?via%3Dihub>

- 49** Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*[Internet].2017[citado 2019 Abr 06] ;15(1)169-178. Disponible <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X17300033#ab005>
- 50** Catalina Bobadilla H, Sandra Carolina RV. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadas a partir de compost obtenido de residuos plaza [Microbiología industrial]. Bogotá: PONTICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA ;2008
- 51** Gloria RF, Sandra MM, Yeides FP, Acela DO, Vera LB, Annia HR. Bacterias solubilizadoras de fosfatos y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *CENIC*[Internet].2015[citado 2019 Abr 06] ;46(1)163-76. Disponible <https://ojs.cnic.cu/index.php/RevBiol/article/view/95/95>
- 52** Elsy Carolina Plazas A. Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras [Microbiología industrial]. Bogotá: PONTICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA ;2007

Anexos

Anexo 1. Ficha técnica semillas de tomate variedad rio grande.



Reino: *Plantae*
Clase: *angiospermae*
Orden: *tubiflorae*
Familia: *Lycopersicum*
Subclase: *dicotyledoneae*
Género: *Lycopersicum*



Especie: *Lycopersicum esculentum*

Planta: Puede desarrollarse de forma rastrera, semirrecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas). Sistema radicular: raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. Seccionando transversalmente la raíz principal y de fuera hacia dentro encontramos: epidermis, donde se ubican los pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes, córtex y cilindro central, donde se sitúa el xilema (conjunto de vasos especializados en el transporte de los nutrientes). **Tallo principal:** eje con un grosor que oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el que se van desarrollando hojas, tallos secundarios (ramificación simpoidal) e inflorescencias. Su estructura, de fuera hacia dentro, consta de: epidermis, de la que parten hacia el exterior los pelos glandulares, corteza o córtex, cuyas células más externas son fotosintéticas y las más internas son colenquimáticas, cilindro vascular y tejido medular. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales.

Advertencia: El contenido del sobre, no es apto para el consumo humano o animal. La semilla es tratada con veneno, productos químicos y/o biológicos.

Recomendaciones:

- * Proteja los germinadores con mallas evitando el ataque de aves, insectos y roedores.
- * Haga su cultivo en climas recomendados para cada especie.
- * Una vez abierto el empaque, utilice la totalidad de las semillas.

Descripción del Producto:

Ciclo de vida total: 30-45 días después del trasplante
Tipo de siembra: Directa -Trasplante
Germinación: 75%
Control de malezas: Manual
Tipo de planta: Buena adaptación
Color: Verde
Sistema de cultivo: Invernadero - Libre exposición
Clima: Medio/cálido
Peso neto: Sobre x 2.00 g.

PROCEDIMIENTOS DE MANEJO:

- * Prepare el germinador, desinfecte y déjelo bien suelto y libre de elementos extraños (insectos, patógenos y maleza).
- * Sembrar en forma regular y espaciada. Cubrir la semilla con una delgada capa de tierra fina y luego aplanar la superficie suavemente.
- * Regar permanentemente en forma de lluvia fina con el fin de mantener siempre húmedo el suelo.
- * Si la especie cultivada es de trasplante hágalo cuando las plántulas tengan una altura de 4 a 6 cm de alto y tengan entre 4 y 6 hojas.
- * Al trasplantar mantenga una distancia de 0.8 a 1.5 mt entre surcos y de 20 a 40 cm sobre surcos.

Calle 34 No. 19-38
PBX: (57) 1 285 1029 – 285 1175 -2851946 FAX: (091) 245 5216
Corabastos: Bodega 41 Local – 14 Tel: (091) 740 1283
E-mail: ventas@semicol.co – Pág. Web: www.semicol.co
Bogotá D. C., Colombia, Suramérica.

Anexo 2. Medio mínimo M9



Medio líquido de crecimiento para cultivo bacteriano, la composición de las sales mínimas de M9 incluye agentes de taponamiento, una fuente de nitrógeno y iones necesarios para completar, adicional, requiere una fuente de carbono para soportar el crecimiento microbiano.

Formulación:

Heptahidrato de fosfato disódico 25.6 g / L

Fosfato monopotásico 6 g / l

Cloruro de sodio 1 g / L

Cloruro de Amonio 2 g / L

PH final: 6.6–7.0 a 25 ° C

Preparación:

Puede requerirse un suplemento dependiendo de la nutrición o necesidades del microbio específico para ser cultivado.

1. Agregue asépticamente 500 mL / L de sales mínimas M9 medio a un recipiente estéril.
2. Agregue asépticamente las siguientes soluciones estériles al envase:
 - a. 20 ml de solución de D-Glucosa al 20%.
 - b. 2 ml de solución de MgSO₄ 1.0 M
 - c. 0,1 ml de solución de 1,0 M CaCl₂

Nota: Para la realización de este trabajo fue remplazada la D-Glucosa al 20% por Glicerol al 20%.

Anexo 3. Medio LB

Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition



LB Agar, Miller se basa según lo descrito por Miller para el crecimiento y mantenimiento de cepas utilizadas en procedimientos de microbiología molecular. Estos son medios nutricionalmente ricos diseñados para el crecimiento de cultivos puros de cepas crecen rápidamente porque proporcionan a las células aminoácidos, precursores de nucleótidos, vitaminas y otros metabolitos que el microorganismo necesita.

Principios del procedimiento

La peptona proporciona nitrógeno, carbono y vitaminas, ciertos oligoelementos son proporcionados por la levadura. Los iones de sodio para el transporte y el equilibrio osmótico son proporcionados por el cloruro de sodio, el agar es el agente solidificante en LB Agar, Miller.

Formulación aproximada por litro:

Peptona 10.0 g

Extracto de levadura 5.0 g

Cloruro de sodio 10.0 g

Agar 15,0 g

Preparación:

1. En L de agua purificada, mezclar bien.
2. Calentar el medio de agar con agitación frecuente y hervir 1 minuto para disolver completamente el polvo.
3. Autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
4. Probar muestras del producto terminado para el rendimiento usando cultivos de controles estables, típicos.

Anexo 4. Solubilización de fosforo en medio SRS.

Componentes	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
KCl	0,2
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,3
Mn SO ₄ . H ₂ O	0,004
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	0,002
NaCl	0,2
Glucosa	10,0
Extracto de levadura	0,5
Purpura de Bromocresol	0,1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0
Agar	18,0

Utilizado para la valoración de la eficiencia

encia relativa de solubilización de los aislamientos, empleando el método propuesto por Sundara Rao y Sinha (1963) sobre el medio SRS, basado en la medición del diámetro de halos de transparencia alrededor de colonias bacterianas que crecen en un medio de cultivo sin formas solubles de PO₄³⁻ pero con fosfato de calcio o hierro, el cual puede ser solubilizado por bacterias que presenten esta capacidad. La eficiencia relativa de solubilización de fosfatos se expresa haciendo una relación del diámetro del halo de solubilización con respecto al diámetro de la colonia.

Para cuantificación y aislamiento de colonias solubilizadoras de fosfatos.

Componentes g/L:

*El fosfato tricálcico se esteriliza aparte y luego antes de dispensar se añade en cabina de flujo al medio. El resto de los componentes se pesan y disuelven; pero antes de esterilizar se ajusta el pH (7-7.2), si es necesario con una solución de (Na OH) 0.1N.

Anexo 5. Composición del medio NFb, libre de nitrógeno

Componentes	g/L
Ácido Málico	5
KOH	4
K ₂ HPO ₄	0,5
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,01
CaCl ₂	0,01
NaCl	0,02
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	0,05
Na MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,002
Mn SO ₄ . H ₂ O	0,01
Azul de Bromo timol	0,1
Agar	15,0

Fuente combinada de carbono, para aislamiento de diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno

Los componentes se pesan y se agregan uno a uno a un Erlenmeyer que ya tenga la mitad del volumen de agua total, es importante que todo el tiempo este el medio en la plancha y con agitación magnética, el agar se agrega después de medir el pH. Y luego se esteriliza.

*Al salir el medio de la autoclave agitar en la plancha, revisar que no esté precipitado y servir.

*sembrar en las cajas de Petri por estría pequeña en el medio de la caja.

Anexo 6. Protocolo AIA

Se siguió la metodología propuesta por Glickmann 1995 y Dobbelaere 1999.

1. Las cepas se sembraron en agar nutritivo suplementado con L-triptófano durante 48 horas.
2. Se colocó papel de nitrocelulosa estéril en la superficie de las colonias bajo oscuridad se incubaron por 24 horas más.
3. Se retiró el papel y se adicionaron dos gotas del reactivo de Salkowsky; Una reacción positiva se observa una coloración rosada que nos indica presencia de índoles

Solución de Salkowsky para determinar AIA.

Preparar una solución de FeCl_3 (12 g/l) ó $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (19,98 g/l) con agua destilada en un vaso precipitado.

Lentamente, agregar la solución de ácido sulfúrico (7.9 M) al vaso precipitado que tiene la solución de FeCl_3 bajo cámara de extracción.

Dejar enfriar la solución y transferir a un balón aforado y completar con agua destilada.

Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente por un período no mayor de un mes.

Cálculos para 100ml de reactivo de Salkowsky:

H_2SO_4 : densidad 1.84g/l, pureza 0,975.

1 Mol de H_2SO_4 = 98,08g

$$7.9 \text{ M } x = 774,83\text{g de } \text{H}_2\text{SO}_4/\text{l}$$

$$77,48 \text{ g para } 100\text{ml.}$$

$$1\text{ml de } \text{H}_2\text{SO}_4 = 1,84\text{g/l} * 0,975 = 1,794\text{g de } \text{H}_2\text{SO}_4$$

$$1,794\text{g} = 1\text{ml } \text{H}_2\text{SO}_4$$

$$77,48\text{g} \quad x = 43 \text{ ml de } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ en } 57 \text{ ml de agua con la solución de } \text{FeCl}_3.$$

.

Anexo 7. Protocolo de lavado y desinfección de semillas.

1. En una toalla absorbente poner el número aproximado de semillas a utilizar.
2. Hacer un nudo en la toalla absorbente con el contenido de las semillas, con el fin de que éstas no se dispersen en el lavado y se pierdan.
3. Realizar tres lavados con agua destilada estéril.
4. Realizar un lavado con alcohol al 30% durante un minuto.
5. Realizar de nuevo tres lavados con agua destilada estéril.

Anexo 8. Solución nutritiva Hoagland.

Fundamento

Una solución nutritiva es la base de la alimentación de la planta, debe cubrir en cada momento sus requerimientos nutricionales. La composición está dada por la adición de un conjunto de nutrientes minerales añadidos a un predeterminado volumen de agua suficientes para el desarrollo óptimo del material vegetal. La solución nutritiva debe tener un pH adecuado dependiente del cultivo y debe permitir la buena aireación de las raíces.

Soluciones Stock según la tabla a continuación

- Pesar y preparar las soluciones de la 1 a la 4 por separado.
- Pesar y preparar la solución de micronutrientes (6-10) en un mismo recipiente.
- Para la solución EDTA de Hierro: en un frasco oscuro disolver 26,1g de EDTA en 268mL de 1N KOH (pH 8). Luego adicionar 24,9g de FeSO₄*7H₂O. Llevar la solución a 1L. Agitar toda la noche.

No	Componente	Solución Stock	Volumen de solución stock/1L (mL)	Elemento	Concentración final (ppm)
1	1 M KH ₂ PO ₄	136g/L	1	N	210
2	1 M KNO ₃	101g/L	5	K	234,59
3	1 M Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	236,15g/L	5	Ca	200,4
4	1 M MgSO ₄ x 7H ₂ O	246g/L	2	Mg	24,305
				S	64,12
				P	30,973
5	EDTA de hierro		1	Fe	
	Micro elementos				
6	H ₃ BO ₃	2.86g/L	1	B	
7	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1.81g/L		Cl	
8	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.22g/L		Zn	

9	CuSO ₄	0.080g/L		Cu	
10	H ₃ MoO ₄ x H ₂ O	0.020g/L		Mo	
11	Agua para completar 1L		985	Mn	

Basic Plant Pathology Methods


Anexo 9. Protocolo para ajuste del inóculo.

Una vez crecido el microorganismo en caldo se debe ajustar el inóculo. Centrifugue el tubo con los 5.0 ml a 7.500 rpm durante 5 min. Retire el sobrenadante y el pellet re suspéndalo en igual volumen de Agua Destilada Estéril (ADE) para inocular semillas vegetales de interés. El inóculo se debe ajustar en un espectrofotómetro a 0.2 Abs a una longitud de onda de 600nm usando como blanco ADE. Una vez distribuidos los 5.0 ml de inóculo en cinco tubos Eppendorf con 1.0 ml de ADE. Tomar uno de estos tubos para realizar el primer ajuste. Ante el espectrofotómetro coloque los mililitros de ADE necesarios para ajustar a 0.2 absorbancias.

Adicione al primer tubo el mismo volumen y verifique que sea igual a 0.2 Abs. Si este valor no corresponde, ajuste con ADE hasta obtener la absorbancia deseada. Para el tercer tubo ajuste el volumen con ADE y verifique en el espectro. El valor de absorbancia debe ser el deseado.

A los otros tubos añadir la misma cantidad de ADE, pero esta vez en condiciones asépticas bajo cabina. De este modo se tendrían todas las muestras a 0.2 absorbancias a una longitud de onda de 600 nm.

Anexo 10. Determinación de Arilsulfatasa en suelo

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA	
	COLECCIÓN O LÍNEA EN LA QUE SE ENMARCA EL PROTOCOLO	
	POE N° 2	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA	Páginas: 4	Fecha Elaboración: 16/12/09
	Elaboró: Yaneth Rodríguez; Augusto Cárdenas y Catalina Camelo.	Revisó: Dra. Luz Marina Melgarejo
	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ARILSULFATASA EN SUELOS	

DETERMINACIÓN DE ARILSULFATASA EN SUELOS ADAPTACIÓN DEL POE No.4 DE AVELLANEDA (2008)

1. Objetivo

Describir el procedimiento para la determinación de la actividad Arilsulfatasa en suelos arroceros por medio de una adaptación del POE No. 4 realizado por Avellaneda (2008) del método de Tabatabai y Bremner, (1970).

2. Principio del método

El método se basa en la determinación del p – nitrofenol liberado después de la incubación del suelo con p – nitrifenil sulfato por 1 hora a 37°C (Alef y Nannipieri, 1995).

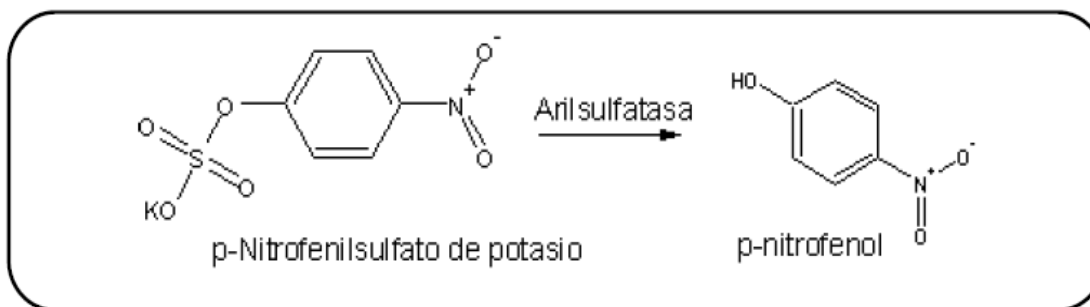


Figura No. 1. Proceso químico para la determinación de Arilsulfatasa en suelos

3. Materiales

- 3.1 Espectrofotómetro
- 3.2 Shaker termostatado
- 3.3 Balanza analítica
- 3.4 pHmetro
- 3.5 Micropipetas
- 3.6 Agitador rotatorio
- 3.7 Centrifuga
- 3.8 Pipeta aforada de 10 ml
- 3.9 Tubos eppendorf 2 ml
- 3.10 Balones aforados de 10, 50, 100, 250 y 1000 ml
- 3.11 Probeta de 50 ml
- 3.12 Frascos de almacenamiento

4. Preparación de reactivos para la curva de calibración

4.1. Solución estándar de p – Nitrofenol/ml

Disolver 0.1 g de p – nitrofenol en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C.

4.2. Solución II de p – Nitrofenol (20 µg p – nitrofenol/ml)

Tomar 2 ml de la solución estándar de p – nitrofenol y llevar a 100 ml con agua destilada

4.3. Buffer Acetato (0.5M, pH 5.8)

Disolver 17 g de acetato de sodio trihidratado en 150 ml de agua destilada, ajustar el pH a 5.8 con ácido acético concentrado. Posteriormente completar a 250 ml con agua destilada. Conservar a 4°C.

4.4. CaCl₂ , 0.5 M

Disolver 18.375 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua destilada.

4.5. NaOH 0.5M

Disolver 5 g de NaOH en 250 ml de agua destilada.

5. Procedimiento experimental para la elaboración de la curva de calibración.

- 5.1. Tomar 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 y 1.0 ml de solución II de p – nitrofenol preparada en el numeral 4.2. Realice todo este procedimiento en tubos eppendorf de 2 ml.
- 5.2. Completar a volúmen de 1 ml con Buffer Acetato de Sodio 0.5M pH 5.8.
- 5.3. Adicionar 0.2 ml de CaCl_2 0.5M.
- 5.4. Adicionar 0.8 ml de NaOH 0.5M.
- 5.5. Agitar en vortex durante 1 min.
- 5.6. Centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- 5.7. Medir absorbancia a 400 nm

6. Cálculos de curva de calibración

Realizar la curva de calibración teniendo en cuenta los valores de absorbancia obtenidos y las concentraciones finales de los estándares de calibración, siendo estas: 0; 2; 4; 6; 8 y 10 μg p – nitrofenol/ml; respectivamente.

7. Preparación de reactivos para la determinación de la Actividad Arilsulfatasa en las muestras de suelo y los respectivos controles

7.1. Buffer Acetato (0.5M, pH 5.8)

Disolver 34 g de acetato de sodio trihidratado en 300 ml de agua destilada, ajustar el pH a 5.8 ácido acético concentrado. Posteriormente completar a 500 ml con agua destilada. Conservar a 4°C.

7.2. Sustrato p – nitrofenilsulfato (PNG 25 mM)

Disolver 0.156 g de p – Nitrofenil sulfato de potasio en 10 ml de MUB pH 6.0, posteriormente completar a volúmen de 25 ml con el mismo buffer. Conservar a 4°C.

7.3. CaCl_2 , 0.5M

Disolver 20g de NaOH en 1000 ml de agua destilada.

7.4. Ácido acético concentrado

8. Procedimiento experimental para la determinación de la Actividad Arilsulfatasa en las muestras de suelo y los respectivos controles

- 8.1. Tomar 0.2g de suelo
- 8.2. Adicionar 0.8 ml buffer acetato de sodio 0.5M pH 5.8
- 8.3. Adicionar 0.2 ml de sustrato p – nitrofenil sulfato de potasio (25mM) a las muestras. No adicionar sustrato p – nitrofenil sulfato de potasio al control.
- 8.4. Incubar 1h a 37°C a 120 rpm.
- 8.5. Adicionar 0.2 ml de sustrato p – nitrofenil sulfato de potasio (25mM) al control. No adicionar sustrato p – nitrofenil sulfato de potasio a las muestras, pues ya se realizó en el numeral 8.2.
- 8.6. Adicionar 0.2 ml CaCl₂ 0.05M
- 8.7. Adicionar 0.8 ml NaOH 0.5M
- 8.8. Agitar en vortex durante 1 min
- 8.9. Centrifugar a 8000 rpm por 10 min a 4°C.
- 8.10. Pipetear 0.4 ml del sobrenadante y llevar a 2 ml con agua destilada
- 8.11. Medir absorbancia a 400 nm

9. Cálculos para determinación de la actividad enzimática

Con base en los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras y los respectivos controles; y mediante la ecuación de la recta determinada previamente para la curva de calibración, se calculan los $\mu\text{g p – nitrofenol (PNP)} \cdot \text{ml}^{-1}$. Posteriormente éstos se introducen en la ecuación que se presenta a continuación, con el objetivo de calcular la actividad enzimática expresada como $\mu\text{gPNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ss} \cdot \text{h}^{-1}$ Tabatabai y Bremner, 1970.

$$\mu\text{g PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ss} \cdot \text{h}^{-1} = ((S - C) \cdot F \cdot V) / (W \cdot \text{Fs/h} \cdot t)$$

Donde,

S = Valor promedio de las muestras ($\mu\text{g PNP} \cdot \text{ml}^{-1}$)

C = Control ($\mu\text{g PNP} \cdot \text{ml}^{-1}$)

V = Volumen del extracto en ml

W = Peso inicial del suelo en g

Fs/h = Factor s/h ó peso seco de 1g de suelo

t = Tiempo de incubación en horas

F = factor de dilución

10. Notas especiales

Este procedimiento debe realizarse para cada una de las réplicas que vaya a tener la metodología, se recomienda como mínimo tres réplicas y dos controles.

Es importante proteger de la luz la reacción luego de adicionar el NaOH 0.5 M para evitar la degradación del complejo coloreado.


Se recomienda utilizar un factor de dilución que arroje absorbancias comprendidas entre el rango medio de la curva de calibración, esto con el fin de tener mayor exactitud.

11. Referencias

Alef, K.; Nannipieri, P. (1995) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. Harcourt & Company, Publishers. Germany. Italy. p. 311-372

Tabatabai, M. A.; Bremner (1970) Arylsulphatase activity in soil. Soil Sci Soc Am Proc 34: 225-229.

Anexo 11. Determinación de fosfatasa ácida y alcalina en suelo.

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA	
	COLECCIÓN O LÍNEA EN LA QUE SE ENMARCA EL PROTOCOLO	
	POE N° 1	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA	Páginas: 5	Fecha Elaboración: 16/12/09
	Elaboró: Yaneth Rodríguez; Augusto Cárdenas y Catalina Camelo.	Revisó: Dra. Luz marina Melgarejo
	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ÁCIDA Y ALCALINA EN SUELOS	

DETERMINACIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA Y ALCALINA EN SUELOS ADAPTACIÓN DEL POE No. 5 DE AVELLANEDA (2008)

1. Objetivo

Describir el procedimiento para la determinación de la actividad Fosfatasa ácida y alcalina en suelos por medio de una adaptación del POE No. 5 realizado por Avellaneda (2008) del método de Tabatabai y Bremmer (1969) y Eivazi y Tabatabai (1977).

2. Principio del método

El método se basa en la determinación del p – nitrofenol liberado después de la incubación de las muestras de suelo solución de bis - p – nitrifenil fosfato por 1 hora a 37°C (Alef y Nannipieri, 1995). El p – nitrofenol liberado por la actividad de la fosfodiesterasa es extraído y coloreado con solución de hidróxido de sodio; finalmente éste es determinado fotométricamente a 400 nm (Tabatabai y Bremner 1969; Eivazi and Tabatabai, 1977).

4.5. Buffer Universal Modificado (MUB pH 11)

Tomar 20 ml de Solución Stock MUB preparada en el numeral 4.3 y llevar a 80 ml con agua destilada. Posteriormente ajustar el pH a 11 con NaOH 0.1M y completar a 100 ml con agua destilada.

4.6. NaOH 1M

Disolver 10 g de NaOH en 250 ml de agua destilada.

4.7. NaOH 0.1M

Disolver 0.4g de NaOH en 100 ml de agua destilada.

4.8. HCl 0.1M

Tomar 1 ml de HCl 32% (10M) y llevar a 100 ml con agua destilada.

4.9. CaCl₂, 0.5M

Disolver 18.375g de CaCl₂ · 2H₂O en 250 ml de agua destilada.

4.10. NaOH 0.5M

Disolver 5g de NaOH en 250 ml de agua destilada.

5. Procedimiento experimental para la elaboración de la curva de calibración.

- 5.1.** Tomar 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 y 1.0 ml de solución II de p – nitrofenol preparada en el numeral 4.2. Realice todo este procedimiento en tubos eppendorf de 2 ml.
- 5.2.** Completar a volúmen de 1 ml con Buffer pH 6.5 o pH 11, para la fosfatasa ácida y alcalina respectivamente.
- 5.3.** Adicionar 0.2 ml de CaCl₂ 0.5M.
- 5.4.** Adicionar 0.8 ml de NaOH 0.5M.
- 5.5.** Agitar en vortex durante 1 min.
- 5.6.** Centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- 5.7.** Medir absorbancia a 400 nm

6. Cálculos de curva de calibración

Realizar la curva de calibración teniendo en cuenta los valores de absorbancia obtenidos y las concentraciones finales de los estándares de calibración, siendo estas: 0; 2; 4; 6; 8 y 10 µg p – nitrofenol/ml; respectivamente.

7. Preparación de reactivos para la determinación de la Actividad Fosfatasa Ácida y Alcalina en las muestras de suelo y los respectivos controles

7.1. Solución Stock de Buffer Universal Modificado (Solución Stock MUB)

Disolver 3.025 g de Tris, 2.9g de ácido málico, 3.5g de ácido cítrico monohidratado y 1.575g de ácido bórico en 125 ml de NaOH 1M. Posteriormente llevar a 250 ml con agua destilada. Conservar a 4°C.

7.2. Buffer Universal Modificado (MUB pH 6.5)

Tomar 100 ml de Solución Stock MUB preparada en el numeral 7.1. y llevar a 250 ml con agua destilada. Posteriormente ajustar el pH a 6.5 con HCl 0.1M y completar a 500 ml con agua destilada.

7.3. Buffer Universal Modificado (MUB pH 11)

Tomar 100 ml de Solución Stock MUB preparada en el numeral 7.1 y llevar a 250 ml con agua destilada. Posteriormente ajustar el pH a 11 con NaOH 0.1M y completar a 500 ml con agua destilada.

7.4. NaOH 1M

Disolver 20 g de NaOH en 500 ml de agua destilada.

7.5. Sustrato p – nitrofenilfosfato hexahidratado para fosfatasa ácida

Disolver 0.2134g de p – nitrofenilfosfato hexahidratado en 20 ml de MUB pH 6.5. Posteriormente completar a volumen de 50 ml con el buffer MUB pH 6.5. Conservar a 4°C.

7.6. Sustrato p – nitrofenilfosfato hexahidratado para fosfatasa alcalina

Disolver 0.2134g de p – nitrofenilfosfato hexahidratado en 20 ml de MUB pH 11. Posteriormente completar a volumen de 50 ml con el buffer MUB pH 11. Conservar a 4°C.

8. Procedimiento experimental para la determinación de la Actividad Fosfatasa ácida y alcalina en las muestras de suelo y los respectivos controles

- 8.1.** Tomar 0.2g de suelo
- 8.2.** Adicionar 0.8 ml buffer MUB pH 6.5 o pH 11, para fosfatasa ácida o alcalina respectivamente.
- 8.3.** Adicionar 0.2 ml de sustrato p – nitrofenilfosfato a las muestras. No adicionar sustrato p – nitrofenilfosfato al control.
- 8.4.** Incubar 1h a 37°C a 120 rpm.

- 8.5. Adicionar 0.2 ml de sustrato p – nitrofenilfosfato al control. No adicionar sustrato p – nitrofenilfosfato a las muestras, pues ya se realizó en el numeral 8.2.
- 8.6. Adicionar 0.2 ml CaCl₂ 0.05M
- 8.7. Adicionar 0.8 ml NaOH 0.5M
- 8.8. Agitar en vortex durante 1 min
- 8.9. Centrifugar a 8000 rpm por 10 min a 4°C.
- 8.10. Pipetear 0.4 ml del sobrenadante y llevar a 2 ml con agua destilada
- 8.11. Medir absorbancia a 400 nm

9. Cálculos para determinación de la actividad enzimática

Con base en los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras y los respectivos controles; y mediante la ecuación de la recta determinada previamente para la curva de calibración, se calculan los $\mu\text{g p – nitrofenol (PNP)*ml}^{-1}$. Posteriormente éstos se introducen en la ecuación que se presenta a continuación, con el objetivo de calcular la actividad enzimática expresada como $\mu\text{gPNP * g}^{-1} \text{ ss * h}^{-1}$ Tabatabai y Bremner, 1970.

$$\mu\text{g PNP * g}^{-1} \text{ ss * h}^{-1} = ((S - C) * F * V) / (W * \text{Fs/h} * t)$$

Donde:

S = Valor promedio de las muestras ($\mu\text{g PNP * ml}^{-1}$)

C = Control ($\mu\text{g PNP * ml}^{-1}$)

V = Volúmen del extracto en ml

W = Peso inicial del suelo en g

Fs/h = Factor s/h ó peso seco de 1g de suelo

t = Tiempo de incubación en horas

F = factor de dilución

10. Notas especiales

Este procedimiento debe realizarse para cada una de las réplicas que vaya a tener la metodología, se recomienda como mínimo tres réplicas y dos controles.

Es importante proteger de la luz la reacción luego de adicionar el NaOH 0.5 M para evitar la degradación del complejo coloreado.

Se recomienda utilizar un factor de dilución que arroje absorbancias comprendidas entre el rango medio de la curva de calibración, esto con el fin de tener mayor exactitud.

11. Referencias

Alef, K.; Nannipieri, P. (1995) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. Harcourt & Company, Publishers. Germany. Italy. p. 311-372

Avellaneda, L. (2008). Actividades enzimáticas de suelos con y sin historia de uso agrícola y manejo convencional y de sus consorcios bacterianos. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Eivazi, F.; Tabatabai, M.A. (1977) Phosphatases in soils. Soil Biology & Biochemistry 9: 167-172.

Tabatabai, M. A.; Bremner. (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology & Biochemistry 1: 301-307.

Anexo 12. Determinación de fosfatasa ácida y alcalina en los aislamientos

Para lograr la determinación de fosfatasas en los aislamientos fue utilizado el protocolo de determinación de fosfatasa ácida y alcalina en suelos desde principio del método hasta, Preparación de reactivos para la determinación de la Actividad fosfatasa ácida y alcalina en las muestras de suelo y los respectivos controles.

1. Procedimiento experimental para la determinación de la Actividad Fosfatasa ácida y alcalina en las muestras de los aislamientos y los respectivos controles

- 1.1. Activar cada uno de los aislamientos en tubo de 50mL con 6mL de caldo nutritivo, dejar en agitación constante a 120 rpm por 24 horas.
- 1.2. Pasadas las 24 horas tomar 1mL del tubo y pasarlo a tubo eppendorf, centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos.
- 1.3. Tomar 500ul de sobrenadante.
- 1.4. Adicionar 200ul buffer MUB pH 6.5 o pH 11, para fosfatasa ácida o alcalina respectivamente.
- 1.5. Adicionar 50ul de sustrato p – nitrofenilfosfato a las muestras. No adicionar sustrato p – nitrofenilfosfato al control.
- 1.6. Incubar 1h a 37°C a 120 rpm.
- 1.7. Adicionar 50ul ml de sustrato p – nitrofenilfosfato al control. No adicionar sustrato p – nitrofenilfosfato a las muestras, pues ya se realizó en el numeral 1.5.
- 1.8. Adicionar 50ul CaCl₂ 0.05M
- 1.9. Adicionar 200ul NaOH 0.5M
- 1.10. Agitar en vortex durante 1 min
- 1.11. Centrifugar a 8000 rpm por 10 min a 4°C.
- 1.12. Pipetear 100ul del sobrenadante y llevar a 500ul con agua destilada
- 1.13. Medir absorbancia a 400 nm

2. Cálculos para determinación de la actividad enzimática

Con base en los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras y los respectivos controles; y mediante la ecuación de la recta determinada previamente para la curva de calibración, se calculan los $\mu\text{g p – nitrofenol (PNP)} \cdot \text{ml}^{-1}$. Posteriormente éstos se introducen en la ecuación que se presenta a continuación, con el objetivo de calcular la actividad enzimática expresada como $\mu\text{gPNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ss} \cdot \text{h}^{-1}$ Tabatabai y Bremner, 1970.

$$\mu\text{g PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ss} \cdot \text{h}^{-1} = ((S - C) \cdot F \cdot V) / (W \cdot Fs/h \cdot t)$$

Donde,

S = Valor promedio de las muestras ($\mu\text{g PNP} * \text{ml}^{-1}$)

C = Control ($\mu\text{g PNP} * \text{ml}^{-1}$)

V = Volúmen del extracto en ml

W = Peso inicial del suelo en g

Fs/h = Factor s/h ó peso seco de 1g de suelo

t = Tiempo de incubación en horas

F = factor de dilución

3. Notas especiales

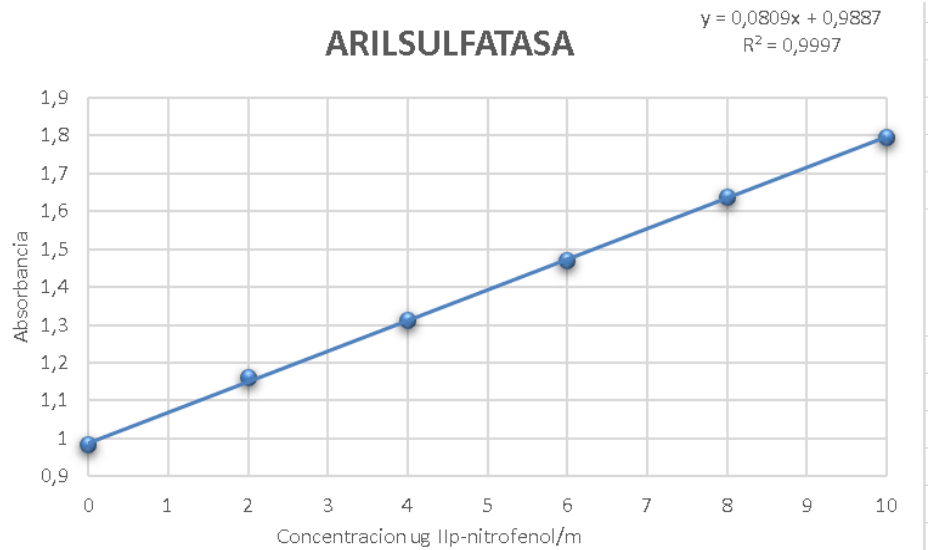
Este procedimiento debe realizarse para cada una de las réplicas que vaya a tener la metodología, se recomienda como mínimo tres réplicas y dos controles.

Es importante proteger de la luz la reacción luego de adicionar el NaOH 0.5 M para evitar la degradación del complejo coloreado.

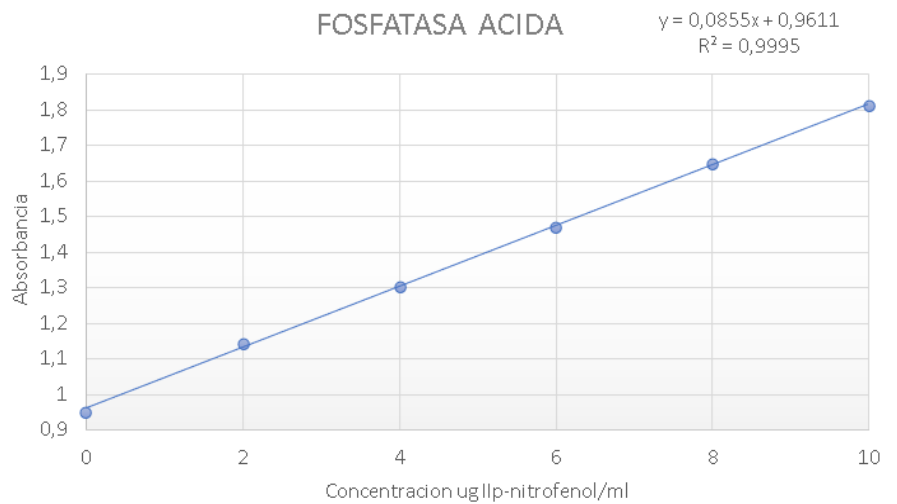
Se recomienda utilizar un factor de dilución que arroje absorbancias comprendidas entre el rango medio de la curva de calibración, esto con el fin de tener mayor exactitud.

Anexo 13. Curvas de calibración reactivos actividad enzimática en suelo.

concentración ug IIp-nitrofenol/ml	absorbancia
0	0,983
2	1,160
4	1,310
6	1,471
8	1,638
10	1,796



Concentracion ug IIp-nitrofenol/ml	Absorbancia
0	0,953
2	1,144
4	1,301
6	1,471
8	1,648
10	1,813



Concentracion ug IIp- nitrofenol/ml	Absorbancia
0	0,972
2	1,144
4	1,318
6	1,473
8	1,650
10	1,826

