



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BACTERIAS PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO VEGETAL PGPR, APLICADAS A CULTIVOS DE PAPA EN  
CONDICIONES DE INVERNADERO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ. MARZO DE 2020**



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BACTERIAS PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO VEGETAL PGPR, APLICADAS A CULTIVOS DE PAPA EN  
CONDICIONES DE INVERNADERO**

**DANIELA ALEJANDRA MORENO BENAVIDES**

**MARÍA FERNANDA MORENO LONDOÑO**

**ASESOR INTERNO**

**MARTHA LUCÍA POSADA BUITRAGO, PhD**

**ASESOR EXTERNO**

**NANCY ISABEL CASTILLO ORJUELA, PhD**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**BOGOTÁ. MARZO DE 2020**

## **DEDICATORIA**

A todos nuestros maestros, por contribuir con su conocimiento en todas y cada una de las etapas de nuestra carrera.

A nuestros padres por siempre apoyarnos, guiarnos y permitirnos con esfuerzo y amor estar en el lugar en el que aprendimos a ser mejores personas y nos formó como profesionales, porque sin su apoyo nuestra formación profesional no habría sido posible.

## **AGRADECIMIENTOS**

Damos gracias a todas las personas que hicieron posible este trabajo.

A nuestras asesoras: Martha Lucía Posada-Buitrago y Nancy Castillo Orjuela, porque sin su conocimiento y guía no sería posible este trabajo, agradecemos su dedicación y paciencia para hacernos mejores en nuestra profesión.

A la docente Yuly Elie Bernal por brindarnos asesoría y espacios para poder desarrollar nuestro trabajo de investigación.

A la Universidad Antonio Nariño, por abrir sus puertas y brindarnos el apoyo para realizar esta investigación.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo General .....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. ANTECEDENTES .....	16
4. MARCO TEÓRICO .....	20
4.1 Importancia económica de los cultivos de ( <i>Solanum tuberosum</i> ) papa en el país. .20	
4.2 Gastos anuales de productores de papa en fertilizantes - rendimiento económico. .....	21
4.3 Alteración de suelos por uso de fertilizantes.....	22
4.4 Características de cepas PGPR .....	23
4.5 Potencial de bacterias PGPR.....	24
4.6 Aplicación de cepas PGPR en cultivos de papa.....	25
4.7 <i>Bacillus pumilus</i> cepa con potencial PGPR.....	26
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	27
5.1 Tipo de investigación: .....	27
5.2 Población y muestra .....	27
5.3 Técnica e instrumentos .....	27
5.3.1 Recolección de muestras de suelo de cultivo de papa (Quiba Alta).....	27
5.3.2 Recolección de muestras de raíces de cultivo de papa (Quiba Alta). ....	28
5.3.3 Aislamiento de microorganismos de suelo por diluciones seriadas. ....	28
5.3.4 Aislamiento a partir de raíces .....	28
5.3.5 Caracterización microbiológica de las bacterias (Gram, MacConkey, King B, Cetrimide, EMB, Rojo Congo y TY). ....	29

5.3.6 Prueba de producción de ácidos y solubilización de fosfatos en medio NBRIP-BPB sólido. ....	29
5.3.7. Prueba de fijación de nitrógeno atmosférico en medio NFb semisólido. ....	30
5.3.8. Repetición de las pruebas en medios NBRIP-BPB, NFb y Rojo Congo-ácido málico con las cepas seleccionadas.....	30
5.3.9. Ensayos de caracterización con pruebas específicas de producción de AIA. ....	31
5.3.10. Ensayos de patogenicidad en semillas de tomate con los microorganismos seleccionados: QA 8, QA 23, QA 44, R11.....	32
5.3.11. Pruebas de Antagonismo microbiano en las cepas seleccionadas.....	33
5.3.12. Determinación del efecto promotor de crecimiento en plantas de papa.....	34
5.3.13. Caracterización molecular de cepas seleccionadas.....	36
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
6.1 Aislamiento y caracterización microbianos.....	38
6.2 Determinación de mecanismos PGPR.....	41
6.2.1 Ensayos de caracterización con pruebas específicas de fijación de nitrógeno atmosférico.....	43
6.2.2 Ensayos de caracterización con pruebas específicas de solubilización de fosfatos. ....	45
6.2.3 Ensayos de caracterización con pruebas específicas de producción de ácido indol acético o aia.....	46
6.3 Antagonismo .....	47
6.4 Determinación de patogenicidad en semillas de tomate.....	48
6.5 Determinación del efecto promotor de crecimiento en plantas de papa en condiciones de invernadero.....	49
6.5.2 Adquisición de masa vegetal sin suplementación extra de nitrógeno o fósforo soluble.....	50
6.5.3 Adquisición de masa vegetal – cepa pgpr vs. cepas seleccionadas.....	51
6.6 Identificación molecular de las cepas aisladas.....	53
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>55</b>

<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	67
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	69
<b>ANEXOS</b> .....	81

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lectura de densidad óptica para ensayo de AIA.....	31
<b>Tabla 2.</b> Ensayos en Agar Hoagland con semillas de tomate y microorganismos aislados.....	32
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de PCR para la amplificación del gen rRNA 16S.....	36
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de PCR para la región ITS1-ITS4 de la levadura R11.....	37
<b>Tabla 5.</b> Mecanismos PGPR de las 22 cepas seleccionadas. Fijación de N <sub>2</sub> y solubilización de fosfato.....	41
<b>Tabla 6.</b> Observaciones por día de resultados para Fijación de Nitrógeno atmosférico en medio NFb. ....	43
<b>Tabla 7.</b> Pruebas de solubilización de fosfatos en medio NBRIP.....	45
<b>Tabla 8.</b> Producción de AIA. ....	47
<b>Tabla 9.</b> Comparación de masa vegetal adquirida por el efecto de las cepas QA8, QA23, QA44 y R11. ....	51
<b>Tabla 10.</b> Comparación de masa vegetal adquirida por el efecto de las cepas QA8, QA23, QA44 y R11. ....	51
<b>Tabla 11.</b> Comparación de masa vegetal adquirida por el efecto de las cepas seleccionadas y la cepa control <i>B. pumilus</i> ATCC 14884. ....	52
<b>Tabla 12.</b> Comparación de masa vegetal adquirida por el efecto de las cepas seleccionadas y la cepa control <i>B. pumilus</i> ATCC 14884. ....	52
<b>Tabla 13.</b> Identificación molecular de las cepas seleccionadas. ....	54

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la metodología usada en el estudio .....	27
<b>Figura 2.</b> Representación gráfica de la prueba de antagonismo microbiano. ....	33
<b>Figura 3.</b> Preparación para cultivo de plantas de papa en invernadero.....	36
<b>Figura 4.</b> Ubicación geográfica de la Vereda de Quiba Alta, Localidad de Ciudad Bolivar...39	
<b>Figura 5.</b> Aislamiento primario de muestras de suelo y raíz de papa en suelos poco intervenido .....	39
<b>Figura 6.</b> Aislamiento de microorganismos en agar nutritivo a partir de suelos poco intervenidos.....	39
<b>Figura 7.</b> Caracterización microscópica e las cepas aisladas mediante tinción de Gram. ....	40
<b>Figura 8.</b> Caracterización en medios especiales selectivos/ diferenciales Cultivos bacterianos en Agar MacConkey .....	40
<b>Figura 9.</b> Caracterización en medios especiales selectivos/ diferenciales Cultivos bacterianos en Agar King B .....	41
<b>Figura 10.</b> Lectura inicial de medios NFb (48 horas después de la inoculación).....	44
<b>Figura 11.</b> Lectura final de medios NFb(14 días después de la inoculación).....	44
<b>Figura 12.</b> Pruebas de solubilización de fosfatos en el medio NBRIP- BPB. ....	46
<b>Figura 13.</b> Producción de AIA.....	47
<b>Figura 14.</b> Prueba de Antagonismo microbiano mediante el método de sensidisco.....	47
<b>Figura 15.</b> Prueba de patogenicidad en semillas de tomate infectadas con los microorganismos seleccionados.....	48
<b>Figura 16.</b> Efecto promotor de crecimiento en plantas de papa en condiciones de invernadero. ....	49

## **Evaluación del potencial de bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR, aplicadas a cultivos de papa en condiciones de invernadero**

### **RESUMEN**

La papa (*Solanum tuberosum*) es un cultivo originario de América del Sur y para muchos núcleos familiares en la región, es base del sustento alimenticio y económico, pero sigue siendo un cultivo tradicional y poco tecnificado, lo que redundaría en un bajo nivel de producción.

El uso de productos químicos en el cultivo de papa es muy alto; en Colombia se estima que se usan tres veces más agroquímicos de lo que necesita un cultivo, lo cual se agrava con la intensificación de la producción, el aumento de la frontera agrícola y la producción en zonas inadecuadas.

La aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, *plant growth promoting rhizobacteria*) ha aumentado el rendimiento de diversos cultivos, generando a su vez la disminución del uso de fertilizantes químicos. Por esta razón, en la presente investigación se realiza una aproximación a la caracterización de cepas con potencial PGPR sobre plantas de papa, para lo cual se aislaron 95 cepas microbianas de rizo suelo natural poco intervenido; de estas se seleccionaron 22 cepas por su bajo potencial como patógenas humanas y, se evaluaron *in vitro* algunos de los mecanismos que podrían usar estas cepas para mejorar el desarrollo de las plantas. De esta forma se eligieron 4 cepas que fueron inoculadas en suelo estéril, para determinar si tenían la capacidad de promover el crecimiento de plantas de papa, sin necesidad de suplementar con nitrógeno o fósforo adicional al existente en el suelo.

Finalmente se pudo determinar que una de las cepas, QA44 identificada como *Pseudomonas fluorescens*, presenta rasgos que la convierten en candidata como posible rizobacteria promotora de desarrollo vegetal.

**Palabras clave:** Promoción crecimiento vegetal, microorganismos, agricultura, alternativa

## ABSTRACT

The potato (*Solanum tuberosum*) is a crop native to South America and for many family nuclei in the region, it is the basis of food and economic sustenance, but it is still a traditional and low-tech crop, which results in a low level of production.

The use of chemical products in potato cultivation is very high; In Colombia, it is estimated that three times more agrochemicals are used than a crop needs, which is aggravated by the intensification of production, the increase in the agricultural frontier and production in inadequate areas.

The application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) has increased the yield of various crops, in turn reducing the use of chemical fertilizers. For this reason, in the present investigation, an approach is made to the characterization of strains with potential PGPR on potato plants, for which 95 microbial strains of, little intervened natural rhizosphere soil, were isolated; Of these, 22 strains were selected for their low potential as human pathogens, and some of the mechanisms that these strains could use to improve plant development were evaluated *in vitro*. In this way, 4 strains were chosen that were inoculated in sterile soil, to determine if they had the capacity to promote the growth of potato plants, without the need to supplement with nitrogen or phosphorus additional to that existing in the soil.

Finally, it was possible to determine that one of the strains, QA44 identified as *Pseudomonas fluorescens*, has traits that make it a candidate as a possible rhizobacteria that promotes plant development.

**Key words:** Promotion of plant growth, microorganisms, agriculture, alternative.

## 1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de bacterias PGPR es una alternativa importante al uso de fertilizantes de compuestos químicos que generan gran concentración de residuos tóxicos en el suelo. Esta alternativa busca, además, reducir el impacto económico que tiene la aplicación de altas cantidades de fertilizantes químicos, y que, a su vez, causan daño a los suelos, principalmente en cultivos de importancia económica para el país como lo son los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*)<sup>1</sup>.

El término de bacterias promotoras de crecimiento vegetal fue introducido por Kloepper y Schroth (1978) para referirse a aquellas comunidades bacterianas del suelo capaces de colonizar diferentes órganos de las plantas y generar efectos benéficos, en ellas se destacan mecanismos de promoción directos propios de las bacterias, como la producción de fitohormonas, solubilización de compuestos fosfóricos y fijación del nitrógeno atmosférico y otros indirectos como el control biológico<sup>1</sup> con lo cual se puede abrir una opción alternativa ecológica y reducir los costos de producción en los cultivos<sup>2</sup>.

En Colombia, el cultivo de la papa se encuentra distribuido a lo largo del territorio en un área de más o menos de 160.000 hectáreas por año, los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y papa criolla (*Solanum phureja*) hacen parte de los principales cultivos de solanáceas de importancia económica<sup>2</sup>, además. el cultivo comercial de esta planta se realiza entre los 2.000 y 3.000 msnm, pero las zonas de óptima producción en función de calidad y cantidad de producto son a los 2500 msnm<sup>3</sup>. Con la finalidad de encontrar alternativas al uso excesivo de fertilizantes químicos y que además se mantenga y/o mejore la producción de papa, la presente investigación es una aproximación a la identificación y caracterización de mecanismos PGPR de cepas microbianas nativas que puedan ser utilizadas como biofertilizantes de manera tal que promuevan el crecimiento de plantas de papa en invernadero, optimizando así la producción de este tubérculo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Evaluar microorganismos nativos con potencial promotor de crecimiento vegetal sobre el desarrollo de plantas de papa en invernadero.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1 Aislar de la rizosfera de plantas de papa, en suelos poco intervenidos, microorganismos con potencial promotor de crecimiento vegetal.

2.2.2 Determinar *in vitro* algunos mecanismos de promoción de crecimiento vegetal como la degradación de fósforo insoluble, fijación de nitrógeno atmosférico o producción de ácido indolacético, por parte de los microorganismos aislados.

2.2.3 Evaluar el efecto promotor de crecimiento vegetal de los microorganismos seleccionados sobre el desarrollo de plantas de papa en condiciones de invernadero.

### 3. ANTECEDENTES

Actualmente, uno de los principales problemas en la agricultura es la acumulación de compuestos químicos en los suelos, lo que hace necesario contemplar alternativas de mejora y remediación de suelos; un estudio realizado por Mehta y Nautiyal en 2001 sugirió la evaluación de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato; en dicha investigación, se trata el tema de los fosfatos inorgánicos aplicados al suelo por medio de los fertilizantes, que al llegar al suelo quedan inmóviles y son incapaces de estar a disposición de las plantas, de manera que se menciona como mediante la microsolutibilización en la rizosfera es posible poner nuevamente a disposición de las plantas este elemento, así como también se menciona la alternativa de inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos del suelo para mejorar el rendimiento de los cultivos y mejorar este bioproceso<sup>4</sup>.

Holguin *et al.*, en 2003 mencionan que las bacterias tienen un papel importante en el mantenimiento de manglares, incluidas las del género *Azospirillum*, que poseen también características PGPR como fijación de nitrógeno atmosférico y la síntesis de altas concentraciones de ácido indolacético, además pueden producir células tipo quiste, las cuales le permiten a esta bacteria resistir a diferentes tipos de estrés ambiental y le brindan la capacidad de adherirse a cualquier sistema de raíces. Determinaron que las bacterias realizan actividades simbióticas junto con las plantas en los manglares<sup>5</sup>.

La rizosfera es la región del suelo donde se encuentra una actividad microbiana muy activa y densa. Osorio *et al.*<sup>6</sup> en su investigación en 2006 mencionan las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) y los múltiples beneficios asociados a la nutrición de las plantas, destacando la fijación de nitrógeno en formas orgánicas que luego puede ser utilizado por las plantas, siendo las más comunes las bacterias de géneros como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, que forman simbiosis, y otras que no forman una simbiosis como las bacterias del género *Azotobacter*. Los autores plantean la importancia del estudio de estas bacterias para la agricultura ya que en suelos erosionados y tratados químicamente con fertilizantes se presenta un gran problema para cultivar, debido a la compactación, la infertilidad y la acidificación de los suelos. Además, cita los efectos de inoculación de la bacteria *Enterobacter agglomerans* que muestra un rendimiento de absorción de fósforo de 13,6 g por planta con respecto al control que absorbe 11,9 g por planta, en un ensayo realizado por Kim *et al.* en 1998.

Se sabe que el mecanismo de *quorum sensing* (QS) juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades vegetales como, por ejemplo, la podredumbre blanda causadas por bacterias patogénicas, enfermedad que involucra moléculas señal pertenecientes al grupo de las N - acil homoserina lactonas (AHLs), relacionadas con QS; de esta forma, Jafra *et al.*<sup>7</sup> en el año 2006, estudiaron la habilidad de bacterias aisladas de rizosfera de papa en la degradación de AHLs, con el objetivo de desarrollar estrategias eficientes de biocontrol de la podredumbre blanda de la papa. Los aislamientos de este estudio pertenecen a los géneros *Ochrobactrum*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, con capacidad de degradar AHL

La aplicación alternativa de biofertilizantes en el suelo, se ha visto de manera positiva por contribuir a la solubilización de elementos como el nitrógeno; en el año 2007 Kumar *et al.*<sup>8</sup> encontraron que las asociaciones planta-microorganismo contribuyen en gran medida a la fijación de nitrógeno presente en el ambiente, la solubilización de fosfato y la producción de fitohormonas, por lo tanto, mejoran el crecimiento de las plantas, siendo la producción de exudados por parte de las raíces de las plantas un elemento importante, ya que influye en la estructuración de las comunidades bacterianas de la rizósfera. En el estudio se observaron mejores interacciones con plantas de algodón y trigo indicando un alto grado de adaptación entre la planta huésped con el microorganismo.

El efecto fitoprotector y biocontrolador que ejercen algunos microorganismos sobre otros causantes de enfermedades en plantas es de gran relevancia. Choudhary *et al.*<sup>9</sup> (2009) mencionan cómo en las últimas décadas se han implementado estrategias de control en las cuales se ven involucrados métodos como los microbiológicos y los moleculares, donde las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) ejercen efectos beneficiosos sobre el crecimiento y desarrollo de las estas.

Maldonado *et al.*<sup>10</sup> (2010), evaluaron diferentes métodos de biorremediación y fitorremediación de suelos contaminados con petróleo, donde establecieron un consorcio microbiano con dos bacterias y dos hongos donde el consorcio permitió una mayor degradación de petróleo con un 47%, mientras que con tan solo fertilización inorgánica no se obtuvo una diferencia significativa con un 49% de degradación de petróleo. De esta forma demostraron que la efectividad de los consorcios y la de fertilizantes químicos en cultivos de leguminosa Guaje es significativa en cuanto a la degradación de HTP (Hidrocarburo totales

de petróleo) en PN (Petróleo nuevo), además que se potencializa el crecimiento de las leguminosas; en cuanto al pasto variedad Egipto, observaron un buen porcentaje de degradación de PI (petróleo intemperizado).

En 2010, Valenzuela *et al.*<sup>11</sup> en un trabajo en plantas de tomate inoculadas con una cepa de *Bacillus subtilis* aislada de plantas de papa, reportaron que la cepa utilizada promovió el crecimiento y generó una respuesta de resistencia sistémica inducida (ISR) contra *Bemisia tabaco*, resultado que fue evidente a las 3 semanas de inoculación.

Patiño<sup>12</sup> en su investigación del año 2010, hace una especial mención al fósforo como un elemento esencial para el desarrollo del metabolismo energético, y otros procesos como la señalización celular; además, trata la absorción microbiana del fósforo, mediada por la reserva en el suelo a través de su biomasa microbiana, donde los organismos del suelo permiten la solubilización del fósforo. La investigación arrojó que las plantas inoculadas con sólo BSP (bacterias solubilizadoras de fosfato), muestran en relación con el testigo sin inocular, un mayor valor absoluto en el contenido de P total en los tejidos de las plantas: 2.62 mg kg<sup>-1</sup> para las plantas tratadas con *Burkholderia lata* y 2.64 mg kg<sup>-1</sup> en el caso de las plantas inoculadas con *Burkholderia ambifaria* vs. 1.98 mg kg<sup>-1</sup> para el testigo sin inocular.

En algunos estudios realizados por Krysciak *et al.* en 2011 a nivel molecular en bacterias del género *Rhizobium* en asocio con las leguminosas, se identificó una mayor expresión de los genes involucrados en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, más que en cualquier otro microambiente; así mismo, se identificó la producción de enzimas como las lactonas de acil-homoserina-lactona (AHLs) involucradas en la generación de *quórum sensing* bacteriano, implicado en la regulación de la formación de biopelículas<sup>13</sup>.

Se ha mencionado que el 80% de las rizobacterias aisladas del suelo tienen la capacidad para producir el regulador de crecimiento de plantas el ácido indol-3-acético (IAA), fitohormona tipo auxina, que es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Fisiológicamente se conoce por ser muy activa y permitir el aumento de células, que a su vez aumentan la rapidez de crecimiento en las plantas, así como también puede generar estados de respuesta a largo plazo (por ejemplo, división celular y diferenciación) en plantas (Shrivastava *et al.*, 2011)<sup>14</sup>.

Es claro que el incremento de la población humana ha obligado a una mayor producción de alimentos, por lo tanto, para acelerar la producción a gran escala de los cultivos naturales se ha implementado la aplicación de compuestos químicos como fertilizantes y pesticidas que pueden llegar a ser tóxicos para los suelos. En un estudio realizado por Sánchez *et al.* en el año 2012 en Colombia, se emplearon cepas bacterianas del género *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. para favorecer la solubilización de fosfatos en el suelo. Los resultados de dicha investigación demostraron la capacidad intrínseca de las cepas para solubilizar una fuente de fósforo poco soluble, donde la utilización de este elemento fue óptima en la presencia de estos microorganismos<sup>15</sup>.

Igualmente, cabe destacar las endosimbiosis radiculares como un tipo común de interacción entre plantas y microorganismos en la tierra. Estas interacciones hacen contribuciones importantes a la nutrición de la planta huésped durante el desarrollo, en cuanto a la fijación de nitrógeno y la disponibilidad de fósforo en la micorriza arbuscular<sup>15</sup>; en las simbiosis fijadoras de nitrógeno, que consisten en nódulos de la raíz de la planta donde participan bacterias, son de gran importancia las del género *Frankia* actuando además como biofertilizantes con gran potencial en cultivos, como lo indica un estudio realizado por Sellstedt *et al.* en 2013<sup>16</sup>. La aplicación de bacterias diazótrofes como alternativa a fertilizantes, mostró, en un estudio realizado por Moreno *et al.* en 2013, una diferencia positiva al potencializar el crecimiento de plantas de maíz con diferentes cepas, algunas pertenecientes a la especie *Stenotrophomonas maltophilia*. En los ensayos con una de las cepas (M10-1) se evidenció notablemente, el aumento en la longitud de tallo (12,7 cm), hojas (0,42 cm) y raíz (24,00 cm) con respecto al control con fertilizante los resultados obtenidos que fue 8,5 cm de longitud del tallo, 0,28 cm en hoja y 16,00 cm en raíz<sup>17</sup>.

Se reconoce que las bacterias promotoras de crecimiento benefician a las plantas a través de diferentes mecanismos como son: la fijación de N<sub>2</sub>, la producción de fitohormonas como el etileno, o de sideróforos, la solubilización de fosfato y la síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas y, el biocontrol de los fitopatógenos. En este sentido, se han estudiado las PGPR del género *Azospirillum*, principalmente por su capacidad para fijar nitrógeno, la síntesis de fitohormonas y otros compuestos, incluyendo auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno y ácido salicílico, que le confieren a las plantas tolerancia al estrés abiótico y biótico; también pueden solubilizar fósforo inorgánico haciéndolo más disponible para las plantas dando como resultado mayores rendimientos (Fukami, 2018)<sup>17</sup>

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Importancia económica de los cultivos de (*Solanum tuberosum*) papa en el país.

La papa, actualmente clasificada taxonómicamente como *Solanum tuberosum*, es una planta de tubérculos con hojas compuestas, con 7 a 9 folíolos (imparipinnadas), de forma lanceolada que se disponen en forma espiralada en los tallos; presentan tres tipos de tallos, uno aéreo, circular o angular en sección transversal, sobre el cual se disponen las hojas compuestas y dos tipos de tallos subterráneos: los rizomas y los tubérculos. La raíz tiene un sistema radical fibroso, ramificado y extendido más bien superficialmente, pudiendo penetrar hasta 0,8 m de profundidad. Las plantas originadas a partir de tubérculos, por provenir de yemas y no de semillas, carecen de radícula. Este es uno de los productos de mayor importancia económica para los campesinos de todas las regiones paperas de Colombia principalmente en Boyacá, Nariño y Cundinamarca. Su cultivo responde a diferentes aspectos ambientales importantes como: precipitación anual de 900 mm, temperatura promedio 10-20°C, altitud entre 1.800 y 3.200 msnm y suelos preferiblemente de textura suelta o franca<sup>19</sup>.

En Colombia, el sector agrícola es considerado indispensable para el crecimiento económico, además de necesario para obtención de materias primas para la industria y fuentes de alimento; al mismo tiempo es por excelencia el sector que más empleo genera, así como divisas por exportaciones, lo que le da un rango de máxima importancia en el crecimiento económico del país. En Colombia, este sector genera más del 20 % de empleo, y casi el 50 % de empleos en el sector rural<sup>20</sup>.

De la misma manera, es importante mencionar que según Cárdenas J y Vallejo L<sup>20</sup>, el informe del Banco Mundial del año 2008 señala que el sector agrícola contribuye al desarrollo del país de tres modos: como actividad económica, como medio de subsistencia, como proveedor de servicios ambientales.

Además, es importante destacar que la papa es un producto muy importante a nivel culinario en Colombia, especialmente por su valor nutricional, su contenido de carbohidratos, vitaminas A, C y complejo B, carotenoides, minerales, fibra y bajo contenido de grasa. La presencia de este tubérculo es indispensable en la mayoría de los hogares, lo que hace que en las regiones paperas sea considerado una gran fuente de sustento; además de generar empleo

e ingresos para los productores, es uno de los cultivos de mayor demanda con propósitos de exportación en muchas de sus variedades y tipos <sup>20</sup>.

Por otra parte, los cultivos familiares son de gran importancia a nivel mundial y en Colombia, ya que según la FAO (*Food and Agriculture Organization - United Nations*) son necesarios para garantizar la seguridad alimentaria mundial, proteger el entorno natural, disminuir la pobreza y la desnutrición, ya que para muchos núcleos familiares en Latinoamérica, es base del sustento alimenticio y económico, pero sigue siendo un cultivo tradicional y poco tecnificado lo que redundaría en un bajo nivel de producción. Adicional a esto, según la FAO, la papa se encuentra clasificada como uno de los cuatro cultivos más importantes del mundo, junto con el trigo, maíz y arroz, por su alto valor nutritivo, adaptabilidad a diversos climas y sistemas de cultivo, y es uno de los diez alimentos de mayor expansión productiva de países en vía de desarrollo <sup>21</sup>.

#### **4.2 Gastos anuales de productores de papa en fertilizantes - rendimiento económico.**

La producción de papa es de gran importancia económica en el país, entre los años 2002 y 2009 (según el Anuario Estadístico del Sector Agropecuario y Pesquero), dentro de los cultivos que aumentaron su rendimiento se encuentran el fríjol, hortalizas, banano, papa, entre otros, y aquellos que representan mayor producción en toneladas son el maíz, la caña de azúcar, y la papa, entre otros <sup>22</sup>.

Por otra parte, se sabe que una gran parte de los costos de producción en cultivos agrícolas es ocasionada por fertilizantes, que tienen como función suministrar nutrientes a la planta para su crecimiento y desarrollo, por lo tanto, a nivel comercial estos compuestos deben tener mínimo un elemento nutritivo; a nivel mundial los más utilizados son aquellos con nitrógeno, fósforo y potasio. En Colombia, el 90% de los fertilizantes son importados y el país es consumidor del 0,375% de estos a nivel mundial <sup>22</sup>.

Según el informe de Gestión Anual de FEDEPAPA (2015), los costos en la producción de papa a nivel nacional son muy variados, pues depende de las condiciones ambientales, región y sistema de producción entre otros, lo cual dificulta el análisis de los costos por hectárea o

unitarios de producción. Para el año 2014, el 41% de los costos de producción fue ocupado por insumos, y de este porcentaje, el 53% estaba representado por enmiendas, abonos y fertilizantes, que en su mayoría son importados<sup>23</sup>.

### **4.3 Alteración de suelos por uso de fertilizantes.**

Un estudio realizado en el año 2015, con respecto a la “identificación de alteraciones del suelo por la actividad agrícola debido a su uso inadecuado y la utilización de agroquímicos en la vereda de Siatame municipio de Sogamoso, departamento de Boyacá”<sup>24</sup>, destaca que Sogamoso es uno de los municipios que más se ve beneficiado económicamente por la actividad agrícola para el suministro del mercado interno. Sin embargo, los procesos típicos en la agroindustria, el mal manejo de las tierras y el uso indiscriminado de agroquímicos han generado una suma total de situaciones que afectan los precios de los productos agrícolas y que con ello no se garantiza una productividad aceptable o suficiente que genere ingresos aceptables para los agricultores.

Además, se describen las técnicas empleadas por los agricultores de la zona de estudio para preparar el cultivo, en las que se incluyen la maquinaria pesada como tractores, el manejo de aguas de riego, el uso de plaguicidas e insecticidas, sustancias que contienen organofosforados y carbamatos, que son altamente tóxicos para los seres humanos y para el ambiente. Sin embargo, es necesario aclarar que sin el uso de estos agroquímicos la producción alimenticia se perdería por el rápido deterioro, las plagas y las enfermedades en las plantas<sup>24</sup>.

Chica *et al.*, en el 2008, mencionan que los agroquímicos y los fertilizantes, son un riesgo de contaminación sobre todo en zonas de alta precipitación como el trópico, donde estos productos suelen pasar casi directamente a través del suelo a las aguas subsuperficiales-acuíferos, debido a la poca retención de nutrientes en el suelo y, en gran medida, por el daño en el mismo suelo, convirtiéndose en fuente de contaminación hídrica, lo que a su vez es un riesgo para la seguridad alimentaria<sup>25</sup>.

Sin embargo, según Moreno *et al*, 2011, el descenso en la producción y la pérdida de fertilización de los suelos agrícolas se asocia al descuido en el abono con los elementos básicos (Nitrógeno, Fósforo, Potasio), lo cual impacta como un error en los cultivos de alta demanda productiva y, por otra parte, puede alterar las condiciones del suelo como el pH.<sup>26</sup>

#### **4.4 Características de cepas PGPR**

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), son microorganismos que se encuentran en contacto con la raíz y generan beneficios en el crecimiento de las plantas, con grandes ventajas agrícolas que, según se conoce, inducen a las plantas defensas y confieren efectos beneficiosos como: aumento del crecimiento de las plantas y una baja susceptibilidad a enfermedades causadas por patógenos<sup>5,6,9,27</sup>. Algunas de las más conocidas como las de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, entre otras, tienen la capacidad de influenciar la tuberización de la papa, además de conferir mayor resistencia a los ambientes salinos y mejorar la síntesis de etileno.<sup>27</sup>

Este tipo de microorganismos se encuentran específicamente en una zona llamada rizósfera (descrito por primera vez en 1904 por Lorenz Hiltner), rica en una gran variedad de nutrientes beneficiosos para los procesos metabólicos de las bacterias. Esta zona está en contacto con la superficie de la raíz, que genera sustancias (carbohidratos y hormonas, entre otros), que promueven el crecimiento microbiano, en donde predominan las bacterias, seguido de algunos hongos, protozoarios y algas<sup>28</sup>.

Las PGPR, junto con otros microorganismos presentes en la rizósfera y en el resto de la planta, forman el fitomicrobioma, que tiene como función ayudar a la planta en la absorción de nutrientes al igual que cuando está bajo estrés por patógenos y otras condiciones. Estos microorganismos cumplen funciones específicas dependiendo de la estructura de la planta en la que se encuentre, pero así mismo, pueden trabajar en conjunto para el beneficio de las plantas, pues esta relación (fitomicrobioma-planta) forma un holobionte<sup>29</sup>.

Las plantas tienen múltiples funciones, entre ellas controlar y/o manejar a los microorganismos presentes en la rizósfera (rizomicrobioma), "La planta también produce

compuestos señal que reclutan especies específicas y regulan sus actividades genéticas y bioquímicas". Estos microorganismos producen compuestos que generan una comunicación con la planta (quórum), y ésta, gracias a procesos de coevolución, puede generar una respuesta a estos compuestos y a la vez un control sobre su rizomicrobioma<sup>6,18,29</sup>.

#### **4.5 Potencial de bacterias PGPR.**

Actualmente, se considera que los microorganismos representan una fuente de factores biológicos de gran utilidad en muchos campos de la actividad humana: salud humana y animal, agricultura, industria o medioambiente. Entre los más importantes descubrimientos de microorganismos con aplicaciones agro-biotecnológicas se encuentran los usados como biofertilizantes (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. o micorrizas)<sup>30</sup>.

Por esta razón, las bacterias con capacidades biológicas dentro de su metabolismo como la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno atmosférico y la producción de metabolitos, hormonas y demás compuestos, representan la base de la formulación de biofertilizantes, y estos son insumos que reemplazan en gran medida a los fertilizantes químicos. Especialmente se ha descrito que para el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) se requiere disponibilidad de una gran cantidad de fósforo en el suelo para favorecer el buen desarrollo radicular y aéreo en la etapa de establecimiento de las plántulas<sup>30</sup>.

Los fertilizantes biológicos son producidos gracias a la selección de microorganismos benéficos presentes en los suelos, conocidos como microorganismos promotores de crecimiento vegetal o PGPR, microorganismos que según Beltrán<sup>30</sup> muestran alta eficiencia a la hora de proveer los nutrientes necesarios para las plantas en formas realmente disponibles y asimilables debido a una serie de transformaciones químicas.

Un ejemplo de dichos microorganismos son las bacterias solubilizadoras de fosfatos que son un grupo de microorganismos PGPR que les permiten a las plantas adquirir de forma más eficiente fosfato, mediante la hidrólisis del fósforo transformándolo a su forma inorgánica soluble conocida como ortofosfatos y haciéndolo asimilable para la planta<sup>31</sup>.

Además de la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfato, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal desarrollan otros mecanismos para cumplir su función, como lo es la solubilización de hierro a través de sideróforos, mejorando así la absorción de este elemento por parte de la planta. Además, algunos estudios dicen que al ser los sideróforos quelantes de hierro, inhiben el crecimiento de patógenos (por ejemplo, hongos), pues no lo dejan disponible en el medio<sup>31</sup>.

Adicionalmente, se afirma que uno de los potenciales efectos destacados de dichos microorganismos asociados a la raíz de las plantas, es contribuir a la resistencia de las plantas a factores de estrés tanto de tipo biológico como no biológico empleando mecanismos que prometen ser una fuerte alternativa para la agricultura sostenible, dentro de los que se destacan: la retención de metales pesados, la degradación de xenobióticos y la producción de fitohormonas.<sup>32</sup>

Desde hace ya varios años, se ha buscado implementar las bacterias PGPR para contribuir especialmente al manejo de estrés abiótico en los cultivos, para garantizar la productividad de las plantas en diferentes condiciones. Etesami *et al* en 2017, afirman que la mayoría de las plantas requieren asociaciones microbianas para la supervivencia<sup>33</sup>, lo que a su vez redonda en la importancia de las bacterias con múltiples beneficios como lo son las solubilizadoras de fósforo y potasio y las fijadoras de nitrógeno, implicadas también en mejorar la resistencia de las plantas en condiciones de estrés.

#### **4.6 Aplicación de cepas PGPR en cultivos de papa.**

Dawam *et al.* en el año 2013 se realizaron un estudio donde aislaron bacterias relacionadas con la raíz de papa para evaluar su potencial como promotor de crecimiento vegetal, puesto que se alude a que los endófitos tienen mayor probabilidad de desarrollar mecanismos que promuevan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Al evaluar el efecto de estas bacterias sobre las plantas se evidenció un aumento significativo del crecimiento de la papa con respecto al control<sup>31</sup>; se aislaron 7 cepas bacterianas, las cuales obtuvieron un mejor rendimiento en ciertos parámetros con respecto al control, el peso fresco de las plantas se

encontró entre 5,2 g y 7,6 g mientras que la planta control pesó 2,9 g; en cuanto al peso seco, en la planta control fue de 0,041 g, y en las demás plantas está entre 0,047 g y 0,083 g.

Además, en 2014 Alvarado *et al.*<sup>34</sup> evaluaron el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la obtención de mini tubérculos de papa en invernadero, donde se inocularon bacterias en la fase de enraizamiento de la papa para estimar la formación de los mini tubérculos, mostrando que a los 15 días de la inoculación las bacterias generaron un mayor crecimiento de las plantas con respecto a las plantas con fertilizantes; los pesos frescos de las plántulas después de la inoculación bacteriana fueron entre 62,75 g y 94,43 g, los cuales fueron superiores al control sin F (47,20 g), y 3 fueron superiores al control con F (67,50 g); en cuanto al peso seco, en la planta control con F fue de 4,62 g, control sin F fue de 2,62 g y el de las demás plantas fue entre 60,38 g y 85,53 g, además, algunas cepas mostraron mayor capacidad para inducir la formación de tubérculos lo que permitió comprobar que la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal es una fuerte alternativa para la obtención de mini tubérculos que disminuiría el uso de agroquímicos<sup>34</sup>.

#### **4.7 *Bacillus pumilus* cepa con potencial PGPR.**

Es importante mencionar que actualmente ya se encuentran cepas de referencia con características ATCC (*American Type Culture Collection*) capaces de promover el crecimiento de las plantas, entre estas, las bacterias formadoras de endosporas aerobias Gram positivas, que pertenecen al género *Bacillus* y *Paenibacillus*, son esencialmente ubicuas y se encuentran abundantemente en la mayoría de los suelos rizosféricos; las especies de estos dos géneros están involucradas en la solubilización del fósforo del suelo, la absorción de micronutrientes, fijación del nitrógeno atmosférico y la producción de fitohormonas entre otras<sup>32</sup>. Son muy pocas las bacterias reconocidas totalmente como promotoras de crecimiento, un ejemplo de estas es *Bacillus pumilus* reconocida por ejercer regulación en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo y cuyas actividades metabólicas en la rizósfera estimulan el suministro de minerales y la absorción de nutrientes por las raíces de las plantas<sup>35</sup>.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 Tipo de investigación:

Este proyecto corresponde a una investigación mixta con enfoque exploratorio de tipo descriptivo

### 5.2 Población y muestra

Bacterias de suelos naturales, poco intervenidos. Bacterias de suelos naturales poco intervenidos de Quiba Alta, Ciudad Bolívar. Bogotá, Colombia

### 5.3 Técnica e instrumentos

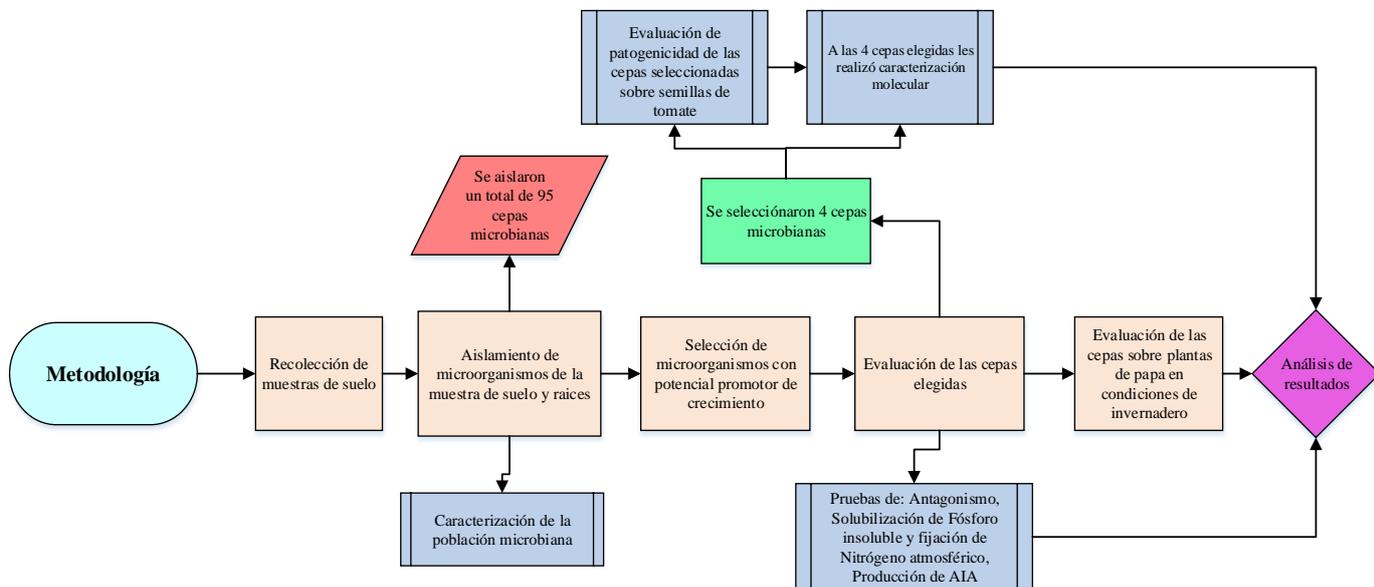


Figura 1. Esquema de la metodología usada en el estudio

#### 5.3.1 Recolección de muestras de suelo de cultivo de papa (Quiba Alta).

Se realizó una excavación del suelo (15 a 20 cm de profundidad), se recogió suelo de seis diferentes puntos del terreno que estaba en contacto con las raíces de las plantas (rizósfera), y se guardó en bolsas plásticas, las muestras se transportaron en nevera de icopor con pilas de hielo y se almacenaron en cuarto frío a 4°C.

### **5.3.2 Recolección de muestras de raíces de cultivo de papa (Quiba Alta).**

Con ayuda de una pala, se sacó una planta de papa por completo del suelo, se sacudió con suavidad para quitar el exceso de tierra y con tijeras estériles se cortaron trozos de las zonas distales de las raíces más finas (10 cm de largo aproximadamente). Se guardaron las muestras en bolsas plásticas, se transportaron en neveras de icopor con pilas de hielo, y se almacenaron en cuarto frío (4°C).

### **5.3.3 Aislamiento de microorganismos de suelo por diluciones seriadas.**

Se realizaron diluciones seriadas en base 10 de 10 gramos de suelo rizosférico, se añadió 1ml de cada dilución ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ ) en agar nutritivo, y se incubó durante 24 horas a 30°C para obtener el primer aislamiento microbiano (Silvia M, 2011)<sup>36</sup>; de este aislamiento inicial se seleccionaron aquellas colonias cuyo aspecto de crecimiento es característico al desarrollado por las bacterias.

### **5.3.4 Aislamiento a partir de raíces**

El aislamiento microbiano se realizó por medio de agitación de una porción de raíces en agua destilada estéril durante 30 minutos. Luego se realizaron diluciones seriadas en base 10 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ), las cuales fueron sembradas en placas con medio de cultivo Rojo Congo (Mauricio, 2006)<sup>37</sup> y Nfb (Baldani, 2014)<sup>38</sup>; se tomaron las colonias

que tenían un color rojizo, pues se intentaba aislar un microorganismo del Género *Azospirillum* y un color azul en el medio (respectivamente), para aislar microorganismos posibles fijadores de nitrógeno atmosférico.

### **5.3.5 Caracterización microbiológica de las bacterias (Gram, MacConkey, King B, Cetrimide, EMB, Rojo Congo y TY).**

Los microorganismos aislados del suelo fueron caracterizados mediante coloración de Gram y crecimiento en medios selectivos diferenciales, finalmente se seleccionaron aquellos aislamientos que no fuesen posibles patógenos humanos, para realizar pruebas de mecanismos PGPR.

### **5.3.6 Prueba de producción de ácidos y solubilización de fosfatos en medio NBRIP-BPB sólido.**

De las cepas aisladas inicialmente, se seleccionaron algunas para evaluación de mecanismos PGPR como fijación de nitrógeno atmosférico con el método de Baldani, *et. al.*, (2014)<sup>38</sup> y/o solubilización de fosfatos, con el método de Nautiyal, *et. al.*, (1999)<sup>39</sup>. Inicialmente mediante la revisión de literatura fue indispensable reconocer si dichos microorganismos eran capaces de fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar compuestos como el fósforo insoluble del suelo, para lo cual se investigó una forma cualitativa de visualizar dicha capacidad en las 4 cepas. Las 22 cepas seleccionadas se conservan en glicerol a  $-70^{\circ}\text{C} \pm 2$ , y en suelo estéril seco a  $19^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

**SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO:** Se realizó la preparación de un medio de cultivo selectivo especial NBRIP (Ver anexo 1), usado en estudios anteriores para evaluar la capacidad de solubilizar fosfatos de forma cualitativa mediante la determinación de halos de solubilización en diámetros. En este medio se inocularon los microorganismos por punción y se incubaron durante un periodo de tiempo de 14 días a temperatura ambiente

de  $19^{\circ}\text{C} \pm 2$  y se monitoreó la formación de halos de solubilización por cada cepa a los cinco días de inoculación, posterior a esto cada dos días hasta completar el tiempo establecido (Nautiyal, CS., et. al., 1999)<sup>39</sup>.

### **5.3.7. Prueba de fijación de nitrógeno atmosférico en medio NFb semisólido.**

FIJACIÓN ATMOSFÉRICA DE NITRÓGENO: Para este ensayo se utilizó el medio especial denominado NFb semisólido, el cual permite evidenciar de forma cualitativa la fijación de nitrógeno de los microorganismos. (Ver Anexo 2). Este medio permite el aislamiento y caracterización de organismos con capacidad enzimática de reducir el nitrógeno, lo que se hace evidente mediante el viraje del color del medio por indicadores de pH. En él se inocularon cada una de las cepas por duplicado y se incubaron durante un periodo de 14 días a temperatura ambiente de  $19^{\circ}\text{C} \pm 2$ , observando constantemente el progreso de cada cepa en el medio (cada dos días desde su inoculación) (Baldani, et. al., 2014)<sup>38</sup>.

### **5.3.8. Repetición de las pruebas en medios NBRIP-BPB, NFb y Rojo Congo-ácido málico con las cepas seleccionadas**

Con el fin de confirmar las reacciones obtenidas inicialmente en cada ensayo de los mecanismos PGPR, se prepararon e inocularon nuevamente los medios especiales NFb y NBRIP para las cepas escogidas finalmente, más la cepa control *Bacillus pumilus* ATCC 14884, usando la misma técnica de siembra, temperatura y tiempo de incubación en cada uno de los ensayos.

La especie seleccionada como control (*B. pumillus*) ya ha sido estudiada y descrita como un aislamiento con potencial PGPR<sup>35</sup>. En un estudio realizado por Pereira et al. ( en Brasil en 2009) hicieron una caracterización de cepas endófitas, y encontraron que una bacteria de la especie *B. pumilus*, mostró una fuerte actividad antagonista inhibitoria

contra hongos, y es capaz de infectar benéficamente plantas de yuca; se encontró también bioactividad por parte de esta bacteria contra los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* , *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsii*. Además es capaz de producir metabolitos de tipo secundario como la pumilacidina (un lipopéptido con actividad antimicrobiana), y posee actividad antiviral y antiulcerosa, por lo tanto esta bacteria se encuentra dentro de los microorganismos con gran potencial a nivel agrícola <sup>40</sup>.

### 5.3.9. Ensayos de caracterización con pruebas específicas de producción de AIA.

Para este ensayo se utilizó el método de Glickman y Dessaux (1995)<sup>41</sup>, el cual permite visualizar la producción de IAA de forma colorimétrica, por medio de un viraje a color rosa en el medio en el que se encuentran los microorganismos una vez es agregado el reactivo de Salkowski.

Se utilizaron resiembras frescas de las cepas seleccionadas junto con el control ATCC 14884, se tomó una asada de colonias aisladas del cultivo y se inocularon en caldo LB con adición de L-triptófano al 0,1%, se incubó durante 24 horas en completa oscuridad, se centrifugaron los tubos, se tomó 1 ml de sobrenadante y 1 ml de reactivo de Salkowski, esto se dejó reaccionar 30 minutos en total oscuridad, posteriormente se realizaron las lecturas de D.O. (Densidad óptica) en un espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Scientific a una longitud de onda de 540 nm. Se realizó una curva de referencia con los valores representados en la tabla 1. El coeficiente de correlación de esta recta patrón fue de 0,8191 y con base en esta se calculó la concentración de producción de AIA en cada cepa microbiana. (En el Anexo 3 se muestra la imagen colorimétrica de patrones de AIA) <sup>42,43</sup>.

**Tabla 1. Lectura de densidad óptica para ensayo de AIA.** Concentraciones y absorbancias para curva patrón de AIA

CONCENTRACIÓN	ABS
0	0
0,5µg/ml	0,02

<b>1 µg/ml</b>	0,035
<b>2 µg/ml</b>	0,063
<b>5 µg/ml</b>	0,074
<b>10 µg/ml</b>	0,145
<b>100 µg/ml</b>	0,202

### 5.3.10. Ensayos de patogenicidad en semillas de tomate con los microorganismos seleccionados: QA 8, QA 23, QA 44, R11

Se utilizaron semillas de tomate de la variedad “Tomate Río grande” de la empresa SEMICOL, las cuales pasaron por un proceso de lavado y desinfección (Protocolo en Anexo 4), posteriormente se dejaron en cámara húmeda durante 15 días para estimular su germinación; una vez empezaron a germinar se realizó el montaje de estas en medio Hoagland más agar y medio Ashby, una vez se inocularon con las cepas seleccionadas.

Cada microorganismo creció durante 24 horas en caldo LB y se lavaron las células (protocolo en el Anexo 5). Se inocularon las semillas con los microorganismos elegidos, 3 semillas por cada placa Petri, (Anexo 6), estas se colocaron en el medio correspondiente (Hoagland más agar y Ashby), QA 8, QA23 Y QA44 y R11:

**Tabla 2. Ensayos en Agar Hoagland con semillas de tomate y microorganismos aislados.**

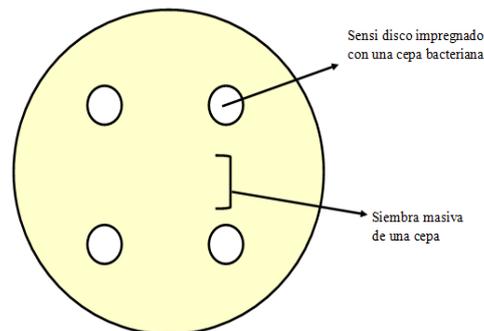
<b>Condición</b>	<b>Descripción</b>
<b>1. Caldo más Hoagland (C+H)</b>	Se inocularon las semillas con el sobrenadante obtenido del caldo con inóculo microbiano, posterior a la centrifugación de las células microbianas
<b>2. Bacterias más medio Hoagland (B+H)</b>	Se inocularon las semillas con las células microbianas lavadas y luego se colocaron en el medio Hoagland.
<b>3. Bacteria más Hoagland más vitaminas (B+H+V)</b>	Se inocularon las semillas con las células microbianas lavadas, previamente al medio Hoagland se le agregó en la superficie una solución preparada de vitaminas y sobre este se colocaron las semillas

\*Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo por microorganismo. En el caso de la cepa R11 se realizaron dos repeticiones de cada ensayo en medio Ashby. Estos ensayos se dejaron incubando dos semanas a temperatura ambiente, en total oscuridad.

Para el ensayo de patogenicidad, se utilizaron semillas de tomate, ya que estas germinan con mayor celeridad que las semillas de papa, además ambas especies pertenecen a la familia *Solanaceae*.

### 5.3.11. Pruebas de Antagonismo microbiano en las cepas seleccionadas

Se realizaron pruebas de antagonismo entre las cepas seleccionadas, se tomó una asada de cada cepa microbiana por aparte y se sembró en caldo LB con una escala de referencia a una concentración de 0,5 McFarland que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  células, se incubó a  $19^\circ\text{C} \pm 2$  durante 24 horas, posteriormente en 4 placas de Petri con agar nutritivo se añadió una gota de cada cultivo líquido, se realizó una siembra masiva con hisopos estériles en cada placa. Se impregnaron discos de papel estéril en cada solución microbiana de la misma concentración 0,5 McFarland y posterior a esto fueron colocados sobre los cultivos en placa para así determinar el antagonismo entre ellas; se incubaron los cultivos a  $19^\circ\text{C} \pm 2$  durante otras 24 horas como se esquematiza en la figura 2.



**Figura 2. Representación gráfica de la prueba de antagonismo microbiano.**

### 5.3.12. Determinación del efecto promotor de crecimiento en plantas de papa

Se realizó un montaje con semillas de papa en suelo, en invernadero ubicado en el laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Antonio Nariño sede Circunvalar - Bogotá, bajo diferentes tratamientos. Para este ensayo, en primer lugar, se utilizó suelo que fue esterilizado dos veces y al cual se le realizó un análisis de fertilidad en el centro de biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (Anexo 13). Para el montaje se limpió el invernadero con toallas absorbentes húmedas y luego con etanol 70%, se lavaron las materas con agua y jabón, y desinfectadas con hipoclorito 0,5%; estas últimas fueron llenadas 3/4 partes con suelo estéril, y posteriormente se colocaron tres semillas de papa por cada matera, previamente lavadas como se muestra en la figura 3.

Se dejaron germinar las semillas de papa durante dos semanas y, una vez se cumplió el tiempo, se realizaron 3 tratamientos: (i) el control con solución Hoagland al 100%, (ii) tratamiento 1 (T1) con solución Hoagland 100% sin adición del nitrógeno en forma de nitrato de amonio  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y, (iii) tratamiento con solución Hoagland 100% sin adición de fósforo soluble en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pero con adición de fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (T2) (Anexo 7).

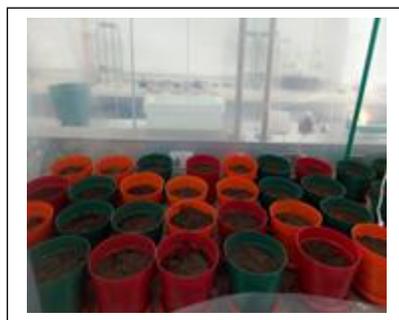
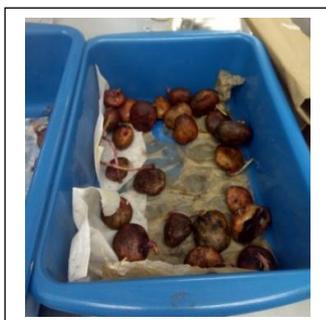
Para los ensayos en suelo se usaron dos controles: como se realiza una comparación del comportamiento de las cepas seleccionadas con una cepa PGPR, se consideró como control positivo a los tratamientos T1 y T2 con la cepa *Bacillus pumilus* ATCC 14884; como control negativo se utilizó el tratamiento con solución de Hoagland completa más cada una de las cepas, ya que se pretende determinar que sin aplicación adicional de nutrientes mayores como nitrógeno o fósforo, las cepas seleccionadas tienen la capacidad de permitir el aprovechamiento de estos elementos presentes de forma natural en el suelo. Si el desarrollo de las plantas de los tratamientos T1 y T2 es menor al obtenido con este último control, se considerará que no hay efecto promotor de crecimiento por parte de las cepas, mientras que, si el desarrollo vegetal es igual o mayor, se podrían atribuir propiedades PGPR a las mismas.

Luego de la siembra de las semillas de papa y, una vez determinado el porcentaje de retención de agua del suelo, en cada matera se agregaron 200 ml de la solución Hoagland

correspondiente a cada ensayo; adicionalmente, una semana después se agregaron los inóculos microbianos correspondientes a cada ensayo; los inóculos fueron preparados a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  ufc/ml, según escala de 0,5 Mcfarland (protocolo en Anexo 8).

Posteriormente a la quinta semana de desarrollo de las plantas se realizó una nueva suplementación con las soluciones Hoagland de cada tratamiento y control, y a la sexta se repitió la inoculación con los microorganismos. En cada materia se cultivaron 3 semillas de papa, y cada uno de los ensayos tenía tres repeticiones de cada microorganismo utilizado, además de un co-inóculo que contenía las cuatro cepas, de modo tal que cada tratamiento contaba con 9 plantas por cepa analizada. Igualmente, hacia la sexta semana se adicionó suelo estéril a cada materia, para cubrir por completo la raíz de las plantas de papa.

Después de que las plantas cumplieron 12 semanas de crecimiento, se procedió a realizar el peso fresco de estas, para lo cual las raíces se lavaron de manera muy cuidadosa intentando extraer el exceso de tierra; así mismo, se cortaron los tallos junto con las hojas, y se procedió a hacer la determinación de peso fresco. Luego, para poder determinar el peso seco, tanto raíces como parte aérea de las plantas se guardaron en bolsas de papel previamente pesadas y promediado su peso; en unas bolsas se guardaron los tallos con las hojas (parte aérea de la planta) y en otras se guardaron las raíces, separadas por tratamiento. Se sometieron a un proceso de secado durante 4 días en un horno a  $65^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser pesadas y obtener los valores de peso seco. La diferencia entre peso fresco y peso seco se estableció como masa vegetal adquirida por las plantas. Estos resultados fueron tabulados para su posterior análisis.



**Figura 3. Preparación para cultivo de plantas de papa en invernadero. A.** Lavado de semillas de papa, **B.** llenado de materas con suelo estéril, **C.** Postura de las semillas de papa en cada matera

### 5.3.13. Caracterización molecular de cepas seleccionadas

Inicialmente se realizó una reactivación de las cepas microbianas para lo cual se usaron cultivos frescos en agar nutritivo, incubados por 24 horas, luego se realizó una nueva siembra en 2 ml de caldo LB y se incubó por otras 16-18 horas. Se utilizó el kit *GeneJET Genomic DNA Purification* de Thermo Fisher Scientific, siguiendo el protocolo del fabricante para purificación de DNA genómico de bacterias Gram-negativas.

Se realizó amplificación por PCR del gen que codifica para rRNA 16S para identificar molecularmente las cepas QA8 y QA23 mediante la secuenciación y su comparación con bases de datos y para verificar la calidad del DNA de la cepa QA44, cuyo genoma completo sería secuenciado. Mediante espectrofotometría se confirmó la concentración y pureza del ADN obtenido. Finalmente, el ADN genómico de la cepa bacteriana QA44 fue enviado para secuenciación a BGI Genomics, y los productos de PCR de las cepas, QA8 y QA23 fueron secuenciados por Corpogen.

Las condiciones de PCR para la amplificación del gen rRNA 16S de la cepa QA44 usando los cebadores 16S rRNA: 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3') y 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y las cepas QA 8 y QA23 usando los cebadores 337F, 518F, 200R y 1100R, se describen a continuación en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen rRNA 16S. A** Mezcla de PCR para las cepas QA44, QA23 y QA8. **B.** Condiciones de amplificación del gen rRNA 16S.

**A.**

Reactivos	Volumen final= 25 µl	Concentración final
PCR- <i>buffer</i> + MgCl 5X	5 µl	1x
dNTPs 10x (2 mM de cada uno)	0.5 µl	0.2 Mm

Pimer F 100 uM	0.125 µl	0.5 Um
Primer R100 uM	0.125 µl	0.5 Um
Taq-polimerasa (3-5 U/ µl)	0.25 µl	1.25 U/reacción
H <sub>2</sub> O PCR, hasta 25 µl	19 µl	
ADN molde	2 µl	
Volumen final	25 µl	

**B.**

5' a 94 °C	1 ciclo
60'' a 94 °C	35 ciclos
45'' a 64 °C	
45'' a 72°C	
5' a 72 °C	1 ciclo

Con relación a la levadura (cepa R11), para la extracción de ADN genómico se usó el el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep de Zymo Research (USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCR, se utilizaron el kit OneTaq Quick-Load 2X (New England Biolabs, USA), los cebadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') según las instrucciones del fabricante, y las condiciones para la amplificación por PCR implementadas están descritas en la tabla 5. El producto de amplificación fue secuenciado por Macrogen (USA)

**Tabla 4. Condiciones de PCR para la región ITS1-ITS4 de la levadura R11. A. Mezcla para la cepa R11 B. Condiciones de Amplificación para la región ITS.**

**A.**

Reactivos	Volumen final= 50 µl
OneTaq Quick-Load 2X	25 µl
ITS 1	1 µl

ITS 4	1 $\mu$ l
ADN	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O PCR, hasta 50 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l

**B.**

45' a 95°C	1 ciclo
50'' a 95°C	30 ciclos
1' a 55°C	
45'' a 68°C	
5' a 68 °C	1 ciclo

## 6. RESULTADOS

### 6.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANOS

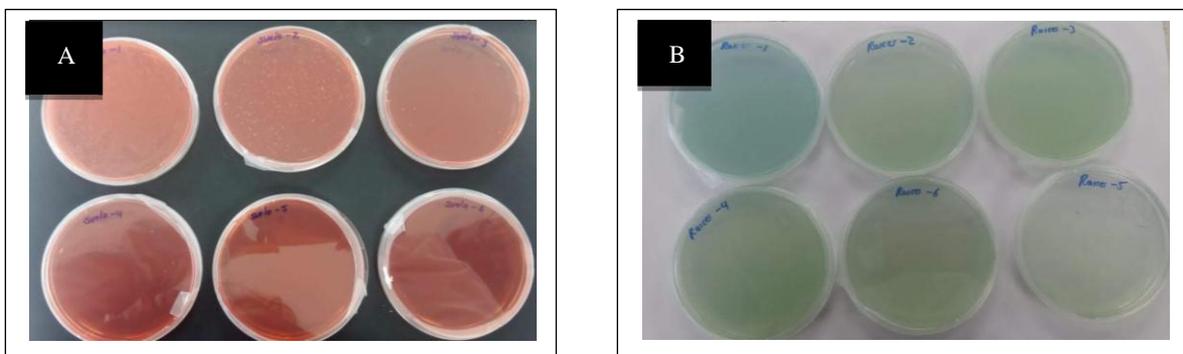
Las muestras de suelo fueron tomadas en la localidad de Ciudad Bolívar, en la Vereda Quiba Alta, la cual tiene un área aproximada de 896,80 hectáreas donde cerca de un 50% corresponde a zonas del Páramo Las Mercedes y Pasquilla. La altitud media de la localidad es de 2768 m.s.n.m. La temperatura tiene un promedio de 14°C, con una temperatura mínima de 9°C y una máxima de 19°C. Las coordenadas geográficas de la localidad son: 4°32'10" N, 74°8'20" W. Dentro de los cultivos reportados se encuentran papa, cebolla y cilantro<sup>43</sup>. Los resultados del análisis fisicoquímico dan cuenta de un tipo de suelo franco arenoso, con un porcentaje alto de Nitrógeno total y fósforo disponible (0,76% y 42,3 mg/Kg respectivamente), (Anexo 13).



**Figura 4. Ubicación geográfica de la Vereda de Quiba Alta, Localidad de Ciudad Bolívar<sup>44</sup>.**

Fuente: <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/15449/1/DuarteFlorezNatalia2019.pdf>

Inicialmente, se realizaron aislamientos a partir de diluciones seriadas del suelo rizosférico y de raíz en agar nutritivo y medios Nfb y Rojo Congo, y se obtuvieron 44 cepas y 51 cepas respectivamente (Figura 5), las cuales fueron resembradas en agar nutritivo para identificar su crecimiento y diferencias morfológicas macroscópicas (Figura 6).



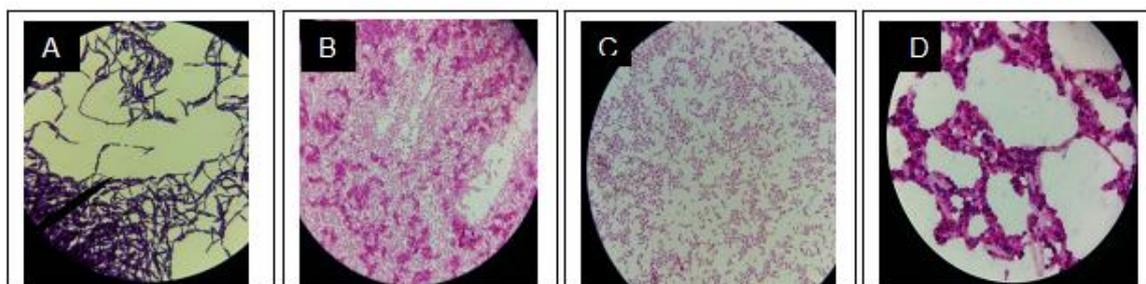
**Figura 5. Aislamiento primario de muestras de suelo y raíz de papa en suelos poco intervenidos. Diluciones seriadas para aislamiento en medio Rojo Congo (A) en medio Nfb (B)**



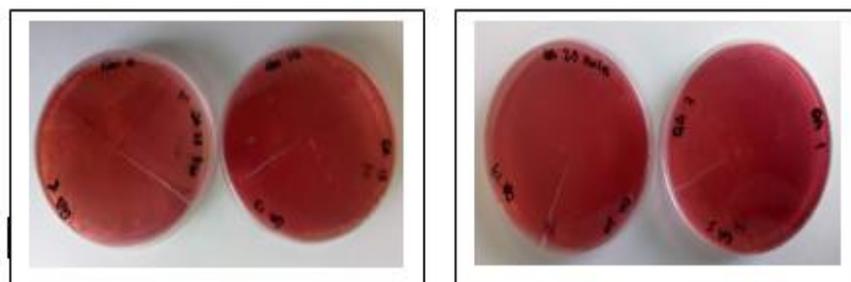
**Figura 6. Aislamiento de microorganismos en agar nutritivo a partir de suelos poco intervenidos.**

Se realizó tinción de Gram y caracterización bioquímica de las cepas aisladas para su identificación (Figuras 7, 8 y 9) que permitieron orientar la determinación de aquellas bacterias con metabolismos similares a las bacterias patógenas humanas, encontrando algunas de los géneros *Klebsiella*, *Escherichia* y *Pseudomonas*, las cuales fueron resembradas en medios selectivos/diferenciales confirmando que estas cepas pertenecían a estos tres géneros y fueron retiradas del estudio las identificadas en los géneros *Klebsiella* y *Escherichia*. Se continuó con la selección de aquellas que no fuesen potencialmente patógenas y aquellas de interés específico de esta investigación (Anexo 8). De esta forma se analizaron 95 cepas microbianas, de las cuales se seleccionaron 22 cepas para análisis posteriores, mientras las restantes que podrían ser patógenas según los análisis bioquímicos realizados se conservaron y guardaron.

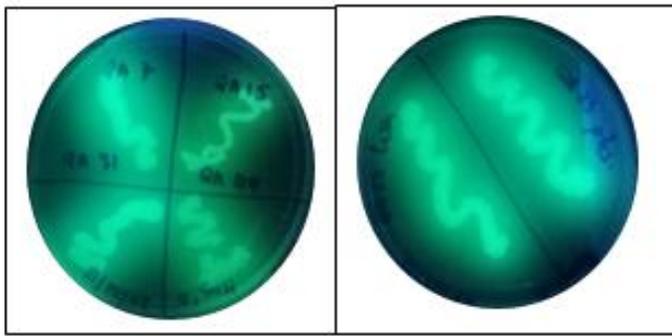
Cabe anotar que, durante el desarrollo del proceso de aislamiento, se pudo determinar que estos microorganismos presentaban mejor crecimiento en temperaturas cercanas a  $19^{\circ}\text{C} \pm 2$ , e incluso algunas crecían bien en cuarto frío, a  $6^{\circ}\text{C} \pm 2$ .



**Figura 7.** Caracterización microscópica e las cepas aisladas mediante tinción de Gram. A. QA8: Bacilos Gram positivos, B. QA23: Bacilos Gram negativos, C QA44: Bacilos Gram negativos, D R11: Estructuras correspondientes a una levadura.



**Figura 8.** Caracterización en medios especiales selectivos/diferenciales Cultivos bacterianos en Agar MacConkey



**Figura 9.**Caracterización en medios especiales selectivos/ diferenciales Cultivos bacterianos en Agar King B

## 6.2 DETERMINACIÓN DE MECANISMOS PGPR

Para la determinación cualitativa de los procesos bioquímicos de las bacterias mediante los cuales las cepas seleccionadas promueven el crecimiento de las plantas se implementaron ensayos de crecimiento en los medios NFb para detección de fijación de nitrógeno atmosférico, y NBRIP-BPB para la detección de solubilización de fósforo inorgánico. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5

**Tabla 5. Mecanismos PGPR de las 22 cepas seleccionadas. Fijación de N<sub>2</sub> y solubilización de fosfato.**

CEPA	NFb	NBRIP
QA 1	++	Negativo
QA 4	-	Negativo
QA 5	+	Negativo
QA 7	++	Positivo
QA 8	++	Positivo
QA 9	+	Negativo
QA 13	+	Negativo
QA 15	++	Positivo
QA 17	-	Negativo
QA 23 LISA	++	Positivo
QA 23 PUNTOS	++	Positivo
QA 24	++	Positivo
QA 27	-	
QA 28	+	Positivo
QA 31	+	Negativo
QA 42	++	Positivo
QA 43	-	Positivo

QA 44	++	Positivo
R1	++	//
R2	++	//
R11	++	//
R15	++	//
Interpretación de medio NFb expresado en cruces: (++) : Azul fuerte, (+) : Azul claro, (-) : Verde. QA: cepas aisladas de suelo rizosférico; R: cepas aisladas de raíz de papa. * Las fotografías asociadas a estos resultados se pueden observar en el Anexo 10.		

El viraje de color del medio NFb de verde a azul se debe a la fijación de nitrógeno, ya que este proceso genera amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) en mayor parte, el cual alcaliniza el medio, haciendo que el indicador de color se torne azul. En la tabla 6 se puede observar como 18 de los microorganismos seleccionados provocan el cambio de coloración en el medio, siendo este viraje fuerte con las cepas QA1, QA7, QA8, QA15, QA23L, QA23P, QA24, QA42, QA44, R1, R2, R11 y R15. Con relación a las cepas QA5, QA9, QA13, QA28 y QA31 es más leve el cambio de color. Las cepas QA4, QA17, QA27 y QA43 no registraron variación de color en el medio. Con relación a la formación de película, la cual indica un crecimiento positivo en el medio, además de la fijación de nitrógeno de las cepas, no fue observable luego de 14 días de incubación.<sup>38,45</sup>

Con respecto a los resultados en medio NBRIP, con el cual se puede determinar la capacidad de solubilización de fosfatos inorgánicos por parte de los microorganismos, se puede observar que 10 de las cepas podían realizar este proceso (QA7, QA8, QA15, QA23L, QA23P, QA24, QA28, QA42, QA43 Y QA44). Las cepas R1, R2, R11 y R15 fueron aisladas de medio NFb sólido, pero no se realizó prueba de fosfatos para estas.

Por otra parte, con relación a las cepas QA23L y QA23P, cuya morfología en medio agar nutritivo sólido parecía ser diferente, se pudo confirmar que se trataba de la misma cepa, ya que al repetir las diferentes pruebas bioquímicas, daban resultados idénticos, razón por la cual las pruebas subsecuentes se realizaron con una única muestra de la cepa QA23L.

Con base en los mejores resultados obtenidos en cuanto a fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y, cuya caracterización bioquímica las excluía como posibles patógenos humanos, se eligieron cuatro cepas microbianas: QA8, QA23, QA44 y R11.

Las diferentes pruebas se repitieron dos veces más con las cuatro cepas seleccionada con el fin de corroborar y confirmar las reacciones inicialmente obtenidas previamente. Inicialmente se evaluó la solubilización de fosfato y la fijación de nitrógeno atmosférico. En los ensayos en medio Nfb se evidenció que las cuatro cepas seleccionadas generaron viraje de color del medio, lo que indica la conversión del nitrógeno en forma amoniacal a nitrato. Por otra parte, no se observó una película blanquecina de las cepas bajo la superficie del medio, lo que puede estar indicando que no fijan el nitrógeno atmosférico. Sin embargo, se continuó con los ensayos con estas cepas por su potencialidad para hacer disponible el nitrógeno para las plantas (Figuras 10 y 11). Los datos de las lecturas pueden observarse en la tabla 6.

### 6.2.1 ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN CON PRUEBAS ESPECÍFICAS DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO.

**Tabla 6. Observaciones por día de resultados para Fijación de Nitrógeno atmosférico en medio Nfb.**

Día 1	INOCULACIÓN		
Día 3	CONTROL	-	-
	R11	-	-
	QA44	+	+
	QA23	+	+
	QA8	+	+
Día 5	CONTROL	-	+
	R11	+	-
	QA44	++	++
	QA23	++	++
	QA8	++	++
Día 7	CONTROL	+	+
	R11	+	-
	QA44	++	++
	QA23	++	++
	QA8	++	++
Día 9	CONTROL	+	+
	R11	++	++
	QA44	++	++
	QA23	++	++
	QA8	++	++
Día 12	CONTROL	+	+
	R11	++	++
	QA44	++	++
	QA23	++	++
	QA8	++	++
Día 14	CONTROL	+	+
	R11	++	++

	QA44	++	++
	QA23	++	++
	QA8	++	++
Resultados obtenidos durante 14 días de observación en medio NFb en donde el control corresponde a la cepa de <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884.			



**Figura 10.** Lectura final de medios NFb (14 días después de la inoculación)



**Figura 11.** Caracterización en medios especiales selectivos/ diferenciales Cultivos bacterianos en Agar MacConkey

En la evaluación *in vitro* de la capacidad de los microorganismos para fijación de nitrógeno atmosférico en el medio de cultivo (NFb) se pudo evidenciar el viraje de color del medio, producto de la conversión del nitrógeno a nitratos por el efecto de las cepas, mientras que se observó un halo muy tenue en la parte superior del medio. El viraje de color se forma por la producción de amonio.

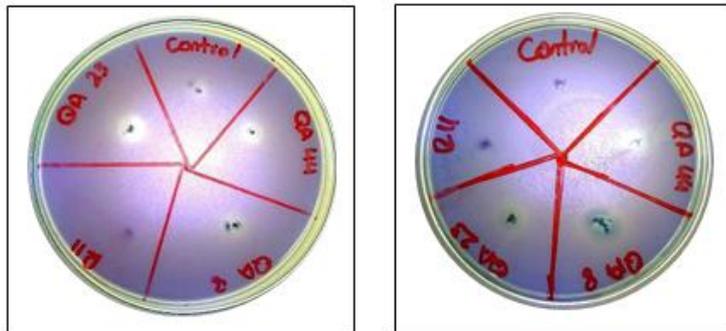
## 6.2.2 ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN CON PRUEBAS ESPECÍFICAS DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS.

**Tabla 7. Pruebas de solubilización de fosfatos en medio NBRIP. El control corresponde a la cepa de *Bacillus pumilus* ATCC 14884**

NBRIP (halo formado medido en cm)			
Día 1	INOCULACIÓN		
Día 5	CONTROL	0,6	0,2
	R11	Sin halo	Sin halo
	QA44	0,7	0,8
	QA23	1	0,8
	QA8	0,8	0,5
Día 7	CONTROL	0,6	0,3
	R11	Sin halo	Sin halo
	QA44	0,8	0,9
	QA23	1	1,1
	QA8	1	0,5
Día 9	CONTROL	0,8	0,5
	R11	Sin halo	Sin halo
	QA44	0,8	1,2
	QA23	1,1	1,2
	QA8	1	0,5
Día 11	CONTROL	1,6	0,9
	R11	Sin halo	Sin halo
	QA44	0,9	1,6
	QA23	1,2	1,3
	QA8	1,1	0,6
Día 14	CONTROL	1,7	1,1
	R11	Sin halo	Sin halo
	QA44	1,1	1,7
	QA23	1,3	1,3
	QA8	1,2	0,7

Fue posible evidenciar de forma cualitativa la capacidad de las cepas seleccionadas para solubilizar el fosfato por medio de la formación de un halo claro alrededor de las colonias en medio NBRIP-BPB (Figura 12). Para este ensayo, se determinó también el diámetro del halo de solubilización con el fin de evaluar progresivamente la formación de este por 14 días. Los resultados de esta prueba pueden observarse en la tabla 7. Luego de los 14 días fue posible identificar que las cepas QA8, QA23 y QA44 son capaces de solubilizar el fosfato, mientras que la cepa R11 no cuenta con dicha capacidad.

Ambos ensayos fueron contrastados con una cepa control de *Bacillus pumilus* ATCC 14884 proporcionada por el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, con la cual se hizo la comparación.



**Figura12. Pruebas de solubilización de fosfatos en el medio NBRIP- BPB.** Se observan reacciones positivas de las cepas QA8, QA23 y QA44.

En cuanto a la capacidad de solubilización de fosfato por parte de las cepas microbianas, midiendo el diámetro del halo de inhibición que se forma alrededor de las colonias en medio NBRIP, se observó que el diámetro de las cepas control ATCC y QA44 oscila entre 1,1 y 1,7 cm, la cepa QA23 presenta un halo de 1,3 cm, y por último el diámetro de la cepa QA8 oscila entre 0,7 cm y 1,2 cm.

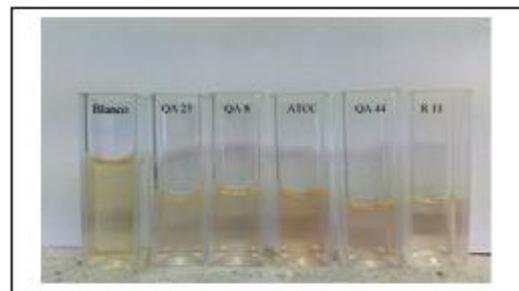
### **6.2.3 ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN CON PRUEBAS ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO O AIA.**

La recta estándar realizada para la determinación de la concentración de AIA arrojó un coeficiente de correlación (R) de 0,818, por lo cual se estimó la concentración de AIA de las cepas seleccionadas con la fórmula de dicha recta patrón.

Los datos muestran que la cepa QA23 produce la mayor cantidad de AIA, seguida por la cepa QA44, las cuales producen más que la cepa control. Así mismo, las concentraciones de AIA producidas por las cepas R11 y QA8 son más bajas que dicha cepa control (tabla 8, figura 13).

**Tabla 8. Producción de AIA. Lectura de D.O en medio LB más L-Triptófano con reactivo de Salkowski**

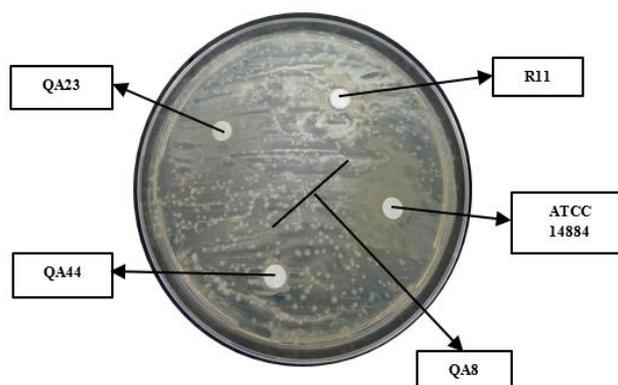
CEPA	µg/ml o PPM
R11	12,58
QA8	17,55
QA23	90,92
QA44	61,07
*Control	30,61
*Control: <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	



**Figura13. Producción de AIA.** Apartir del sobrenadante de medio LB más L-Triptófano con reactivo de Salkowski

### 6.3 ANTAGONISMO

Las pruebas de antagonismo se realizaron con el fin de identificar si alguna de las cuatro cepas microbianas tiene la capacidad de inhibir a otras o, si entre ellas había algún tipo de competencia natural. Luego de la incubación y la lectura a las 24 h de crecimiento de los microorganismos en agar nutritivo fue posible determinar que las QA8, QA23, QA44 y R11 no ejercen inhibición de crecimiento entre ellas, ya que fueron capaces de crecer en conjunto sin problemas o limitaciones del crecimiento, deterioro o muerte por competencia entre ellas (figura 14).



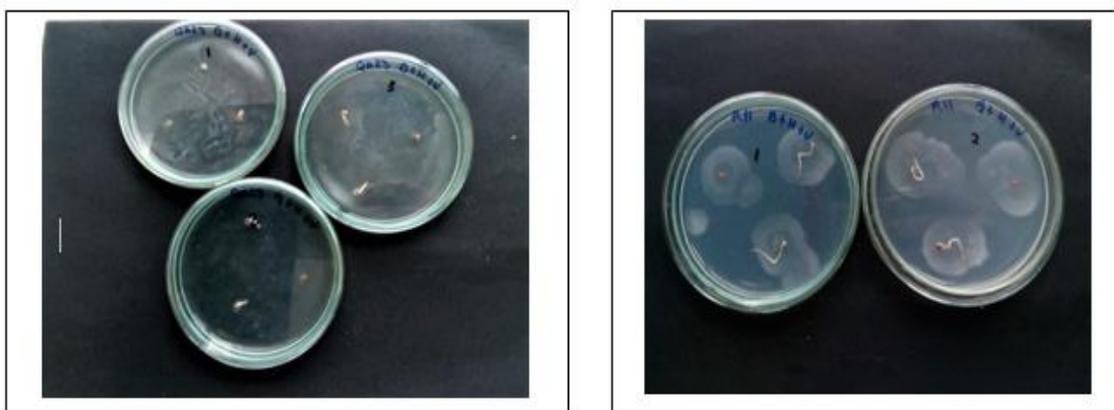
**Figura 14. Prueba de Antagonismo microbiano mediante el método de sensidisco**

## 6.4 DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD EN SEMILLAS DE TOMATE

Con esta prueba se pretendía determinar de manera cualitativa si alguna de las cepas seleccionadas podría causar daño a las semillas, y se realizó con semillas de tomate teniendo en cuenta la celeridad con que estas germinan (ya que su germinación es más rápida con respecto a las semillas de papa); es importante destacar que tanto la papa (*Solanum tuberosum*) como el tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenecen a la misma familia (*Solanaceae*). Esto permite hacer un acercamiento a las posibles afecciones que comparten estas dos plantas, deduciendo que, al causar daños en las semillas de tomate podrían también afectarse las semillas de papa, debido al comportamiento genético, bajo el que se ha establecido que, al pertenecer a la misma familia, dichas plantas son generalmente susceptibles a las mismas enfermedades<sup>44</sup>.

En el ensayo se inocularon semillas de tomate con las cepas QA8, QA23, QA44 y R11. Luego de 15 días de incubación, se observó que las semillas germinaron a pesar de la presencia de los microorganismos a su alrededor, y no mostraron ningún tipo de podredumbre húmeda, manchas o pecas, signos característicos de daño por patogenicidad en semillas y raíces.

La Figura 15 permite evidenciar los resultados obtenidos en el ensayo, donde se observa germinación de algunas de las semillas a pesar del crecimiento microbiano alrededor de ellas, este ensayo arrojó resultados de tipo cualitativo, debido a que con el mismo se quería determinar si los microorganismos seleccionados producían efectos adversos sobre el crecimiento de las raíces, mas no tasa de germinación en sí.



**Figura 15. Prueba de patogenicidad en semillas de tomate infectadas con los microorganismos seleccionados.** Semillas con raíz en medio Hoagland más agar infectadas con microorganismos seleccionados

## 6.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROMOTOR DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE PAPA EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Con este ensayo se buscó determinar si la adición de los microorganismos seleccionados influye en el crecimiento de plantas de papa cultivadas en suelo y si la suplementación extra de macroelementos como nitrógeno y fósforo es necesaria para obtener un crecimiento adecuado de plantas de papa.

Con este fin, se cultivaron plantas de papa en suelo estéril y bajo condiciones de invernadero, suplementando el suelo con solución nutritiva Hoagland al 100% para el tratamiento control (C), además de realizar un tratamiento (T1) con solución Hoagland 100% sin adición del nitrógeno, y otro tratamiento con solución Hoagland 100% sin adición de fósforo soluble, pero con adición de fosfato tricálcico (T2) (Anexo 7).



**Figura 16. Efecto promotor de crecimiento en plantas de papa en condiciones de invernadero.** Crecimiento de plantas de papa bajo tres condiciones A: Suelo con Hoagland 100% (C); B: Suelo con poco nitrógeno (T1); C: Suelo sin fósforo soluble (T2).

Además, se realizó el análisis del suelo usado en estos ensayos (Anexo 14) que mostró la presencia de nitrógeno mineralizado (88,8 ppm), nitrógeno en forma de amonio (65,6 ppm) y nitrógeno en forma de nitrato (23,2 ppm), y la de fósforo en una concentración de 109,8 kg/ha, aunque no se conoce si este está en forma asimilable para las plantas.

### **6.5.2 ADQUISICIÓN DE MASA VEGETAL SIN SUPLEMENTACIÓN EXTRA DE NITRÓGENO O FÓSFORO SOLUBLE**

A lo largo de 12 semanas de crecimiento de las plantas de papa, se realizaron 2 aplicaciones tanto de solución nutritiva Hoagland (en la semana 3 y 8) y 2 aplicaciones de dilución bacteriana (semanas en las semanas 4 y 9).

Al finalizar este periodo, en la semana 13, se evaluó la adquisición de masa vegetal, para lo cual se realizó la determinación de peso fresco y peso seco, y el porcentaje de obtención de masa vegetal, con respecto al control de tratamiento con solución nutritiva completa (SNC) Hoagland 100% más las cepas, y por otra parte, con respecto a la cepa control. Estas estimaciones se realizaron tanto de la parte aérea como de las raíces de las plantas, con los diferentes tratamientos (T1 y T2), y se describen a continuación.

Al realizar la comparación de la masa vegetal adquirida por las plantas de papa, entre los suelos suplementados con solución nutritiva Hoagland 100% (control) y el efecto que podría tener la adición al suelo de ciertas cepas microbianas para permitir la asimilación de nitrógeno o fósforo disponible, se encontró que, con el tratamiento 1 (sin adición de nitrógeno), la raíz de las plantas suplementadas con la cepa QA8 adquieren más del doble de masa vegetal respecto al control, seguido por el efecto generado por la cepa ATCC 14884. Con las cepas R11 y QA44 este valor es ligeramente superior, mientras que con la cepa QA23 y el co-inóculo es incluso inferior al control (Tabla 9).

Con relación a la parte aérea, y con el tratamiento T1, ninguna de las cepas promueve la adquisición de masa vegetal superior o igual a la obtenida con el suplemento de solución nutritiva completa, sin embargo, con la cepa control, el co-inóculo, y la cepa QA44, respectivamente, se observó que la adquisición de masa vegetal es ligeramente inferior.

**Tablas 9 y 10. Comparación de masa vegetal adquirida por el efecto de las cepas QA8, QA23, QA44 y R11.**

<b>Tabla 9. Adquisición masa vegetal (%): Tratamiento bajo en nitrógeno (T1) vs. SNC</b>		
<b>CEPA</b>	<b>RAÍZ (%)*</b>	<b>PARTE AÉREA (%)*</b>
QA 8	129,4	-11,0
QA23	-31,0	-37,6
QA44	3,5	-7,4
R11	7,5	-9,7
Co-inóculo	-24,9	-3,9
ATCC	30,9	-3,7

SNC: solución nutritiva Hoagland 100%. \*Donde el 100% es el valor del control

<b>Tabla 10. Adquisición masa vegetal (%): Tratamiento sin fósforo soluble (T2) vs. SNC</b>		
<b>CEPA</b>	<b>RAÍZ (%)*</b>	<b>PARTE AÉREA (%)*</b>
QA 8	-3,8	0,0
QA23	-26,8	11,5
QA44	16,8	24,1
R11	-10,5	-13,7
Co-inóculo	0,2	-33,6
ATCC	74,1	-20,9

SNC: solución nutritiva Hoagland 100%. \*Donde el 100% es el valor del control

En el tratamiento T2 (sin adición de fósforo soluble, tabla 10), es posible observar que la ganancia de masa vegetal de la raíz con la cepa ATCC 14884 es superior al control y al de las cepas seleccionadas para este estudio, sin embargo, con la cepa QA44 se consigue un aumento ligeramente significativo, y con el co-inóculo el efecto es similar al control. Con las cepas QA8, R11 y QA23 la masa vegetal de la raíz es inferior al control.

En cuanto a la masa vegetal de la parte aérea obtenida en el tratamiento T2, se adquirió menos con respecto al control con el co-inóculo y las cepas R11 y ATCC 14884, mientras que se consigue un efecto similar al control con la cepa QA8, ligeramente superior con la cepa QA23, y significativamente superior con la cepa QA44.

### **6.5.3 ADQUISICIÓN DE MASA VEGETAL – CEPA PGPR VS. CEPAS SELECCIONADAS**

Los resultados muestran que con el tratamiento T1, la masa vegetal adquirida en la raíz de la cepa QA8 es superior a la cepa control, así como a las otras cepas. Por otra parte, también se

puede observar que ninguna de las otras cepas adquiere un valor igual o más alto que la cepa control. Las cepas que tienen un valor significativamente aproximado al control son QA44 seguida de la cepa R11 (Tabla 11).

Con respecto a la masa vegetal de la parte aérea, con el co-inóculo se obtiene un porcentaje superior al obtenido con la cepa control, mientras que, con las otras cepas, la masa vegetal adquirida es menor respecto a esta. Los registros para las cepas R11, QA8 y QA44 son ligeramente menores los de la cepa control. Para la cepa QA23, la masa vegetal adquirida es inferior comparada con todas las cepas analizadas.

Con relación a los resultados con el tratamiento T2, se puede observar que la masa vegetal adquirida en la raíz con las cuatro cepas seleccionadas es inferior respecto a la cepa control, sin embargo, la masa vegetal aérea obtenida es significativamente superior con las cepas QA44, QA23 y QA8. Así mismo, este valor es ligeramente superior para la cepa R11, y ligeramente inferior para el co-inóculo, respecto a la cepa control (Tabla 12).

**Tabla 11. Adquisición masa vegetal (%): Tratamiento bajo nitrógeno (T1) vs. cepa *B. pumilus* ATCC 14884**

CEPA	RAÍZ (%)	PARTE AÉREA (%)
QA 8	99,92	-2,54
QA23	-25,08	-33,67
QA44	-6,72	-7,64
R11	-10,55	-0,96
Co-inóculo	-19,41	9,30
ATCC	0,00	0,00

**Tabla 12. Adquisición masa vegetal (%): Tratamiento sin fósforo soluble (T2) vs. cepa *B. pumilus* ATCC 14884**

CEPA	RAÍZ (%)	PARTE AÉREA (%)
QA 8	-36,99	33,22
QA23	-40,21	44,31
QA44	-20,86	50,71
R11	-44,04	15,17
Co-inóculo	-19,14	-8,03
ATCC	0,00	0,00

**Tablas 11 y 12.** Comparación de masa vegetal adquirida por el efecto de las cepas seleccionadas y la cepa control *B. pumilus* ATCC 14884. (\*) El porcentaje esta dado según la relación entre la masa

La masa vegetal aérea adquirida con el tratamiento T2, evidencia un desarrollo significativamente mayor con las cepas QA44, QA23, QA8 y R11, respectivamente, con relación a la cepa control, a pesar del desarrollo inferior de las raíces.

## 6.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS

De los aislamientos inicialmente obtenidos, se seleccionaron cuatro para identificación molecular por sus características como promotoras del crecimiento vegetal. La amplificación de los productos de PCR de la región 16S del ADNr de las cepas bacterianas QA8 y QA23, los amplicones obtenidos con los cebadores 337F, 518F, 200R y 1100R generaron fragmentos entre 812pb y 1349pb. Mientras que para la región ITS del ADN de la levadura R11 se obtuvo un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases, se realizó también un corrido electroforético para el ADN de la cepa QA44 y productos de PCR de la cepa R11 (ver Anexo 14).

Con relación a la cepa QA44, el genoma fue secuenciado usando el sistema Illumina HiSeq 4000 en el Instituto de Genómica de Beijing (Shenzhen, China). Las lecturas (*reads*) secuenciadas fueron ensambladas usando el software SOAPdenovo v1.05. Con base en el genoma, se determinó que la cepa QA44 es *Pseudomonas fluorescens*.

En la tabla 13 se puede observar el análisis por BLASTN el cual arroja el mayor porcentaje de identidad que permite identificar a las cepas estudiadas como: QA8 *Bacillus simplex*, QA23 *Pseudomonas poae*, QA44 *Pseudomonas fluorescens*, R11 *Apiotrichum porosum*

**Tabla 13. Identificación molecular de las cepas seleccionadas.** Se muestran los resultados del análisis por BLASTN, relacionando el número de acceso del organismo con el cual hay mayor porcentaje de identidad, y con mayor cobertura del fragmento secuenciado.

AISLAMIENTO	IDENTIDAD EN GenBank	No. de acceso	Tamaño fragmento (pb)/cobertura (%)	Porcentaje de identidad	Valor e
QA8 (primer 337F)	<i>Bacillus simplex</i> – genoma completo	CP017704.1	1222/90	99.55%	0.0
QA8 (primer 518F)	<i>Bacillus simplex</i> – genoma completo	CP017704.1	1031/91	99.36%	0.0
QA8 (primer 800R)	<i>Bacillus simplex</i> – genoma completo	CP017704.1	830/91	99.87%	0.0
QA8 (primer 1100R)	<i>Bacillus simplex</i> – genoma completo	CP017704.1	1157/91%	99.62%	0.0
QA23 (primer 337F)	<i>Pseudomonas poae</i> – secuencia parcial	NR_028986.1	1252/90	97.88%	0.0
QA23 (primer 518F)	<i>Pseudomonas tolaasii</i> – secuencia parcial	NR_117823.1	1076/88	99.05%	0.0
	<i>Pseudomonas poae</i> – secuencia parcial	NR_028986.1	1076/88	98.95%	0.0
QA23 (primer 800R)	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> – ensamblaje de genoma	LT629689.1	812/91	99.19%	0.0
	<i>Pseudomonas poae</i> – secuencia parcial	NR_028986.1	812/90	99.18%	0.0
QA23 (primer 1100R)	<i>Pseudomonas trivialis</i> – secuencia parcial	AJ492831.1	1349/76	99.13%	0.0
	<i>Pseudomonas poae</i> – secuencia parcial	NR_028986.1	1349/76	99.12%	0.0
QA44 secuencia genómica completa (6,821,050 pb)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TaxID 294[UID]	4.938.104/79.82	95.70%	
R11 (primer ITS1)	<i>Apiotrichum porosum</i> – región ITS	NR_073209.1	500/98%	99.19%	0.0
Linaje	Eukaryota; Opisthokonta; Fungi; <i>Dikarya</i> ; <i>Basidiomycota</i> ; <i>Agaricomycotina</i> ; <i>Tremellomycetes</i> ; <i>Trichosporonales</i> ; <i>Trichosporonaceae</i> ; <i>Apiotrichum</i>				

## 7. DISCUSIÓN

La práctica de inocular plantas con microorganismos benéficos como las bacterias promotoras de crecimiento vegetal se remonta a siglos atrás. Los campesinos conocían de manera empírica que una forma de mejorar las cosechas era mezclar el suelo que quedaba de anteriores cultivos exitosos de leguminosas con suelo en el cual no habían crecido previamente. Fue solo hasta finales del siglo XIX que se dio inicio a la inoculación de suelos con microorganismos capaces de promover el crecimiento de las plantas, siendo las bacterias del género *Rhizobium sp* las primeras en ser implementadas en los cultivos de leguminosas.<sup>65</sup>

Hoy en día, los biofertilizantes de naturaleza bacteriana, que incluyen bacterias como *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Acinetobacter* o *Chromobacterium*, representan una herramienta biotecnológica sistémica por lo que a su vez los microorganismos son capaces de mejorar el proceso de nutrición de las plantas, su vitalidad, vigor y la resistencia a diversas plagas y enfermedades; además las bacterias PGPR capaces de solubilizar fósforo insoluble y fijar el nitrógeno atmosférico, resultan una alternativa fácil de emplear y económicamente viable, siendo amigable con el medio ambiente y favoreciendo la salud del consumidor, disminuyendo el contacto con compuestos tóxicos a largo plazo<sup>76</sup>.

Sin embargo, en la mayoría de los países en desarrollo de Centroamérica y Suramérica la tecnología de inoculantes biológicos no ha tenido mayor impacto sobre la productividad de cosechas y cultivos familiares, debido a las costumbres heredadas de forma familiar y la implementación de fertilizantes químicos comunes, lo que conlleva a que la mayoría de las familias no consideren en su práctica los biofertilizantes para incrementar la productividad y conservación de suelos.

Por otra parte, en Colombia el cultivo de papa cumple un papel de gran importancia económica, que se ratifica en la alta demanda de esta, y en cuanto a los costos de producción de papa, a nivel nacional son muy variados pues depende de las condiciones ambientales, sistemas de producción y regiones; estos son mayoritariamente invertidos en fertilizantes químicos que tienen como función suministrar nutrientes a la planta para su crecimiento y desarrollo<sup>26</sup>.

En la agricultura uno de los principales nutrientes es el nitrógeno, indispensable para el crecimiento de las plantas, y en el caso de la papa, importante para la tuberización de la misma; sin embargo, “en suelos carentes de nitrógeno ha sido necesario implementar el uso de fertilizantes nitrogenados para aumentar el rendimiento de los cultivos, sin embargo, el uso de estos de manera indiscriminada y las pérdidas producidas posterior a la aplicación (por medio de erosión, lixiviación y volatilización), pueden ocasionar problemas graves de contaminación en los suelos” lo que en consecuencia se relaciona con la salinización y variación en condiciones de pH del suelo disminuyendo a su vez la biomasa bacteriana contribuyente a la fijación de nitrógeno en los agrosistemas<sup>62</sup>.

Para el desarrollo inicial de esta investigación fue necesario seleccionar y catalogar de forma exhaustiva microorganismos aislados de suelos sin mayor uso agrológico, mediante identificación bioquímica para evitar, en primera instancia, usar bacterias con potencial de generar enfermedad en los seres humanos, ya que durante los últimos años, el número de infecciones humanas causadas por patógenos oportunistas ha aumentado significativamente, y el suelo, especialmente la rizósfera, es un reservorio muy amplio y significativo, en donde podemos encontrar incluso, microorganismos antagonistas y con genes de resistencia a los antibióticos, lo que en consecuencia, conduce a evitar el uso de microorganismos patógenos en investigaciones de tipo ambiental<sup>50</sup>. Las diferentes pruebas bioquímicas realizadas a un total de 95 cepas de microorganismos permitieron seleccionar 4 cepas que en principio no parecen tener metabolismos asociados a patogenicidad para humanos (Anexo 9), características que, junto al hecho de desarrollarse mejor en temperaturas entre 28°C y 33°C, les proporcionan un sello distintivo como microorganismos ambientales ya que a lo largo de la investigación mostraron que la temperatura óptima para su desarrollo oscila entre los 17 y 21°C. En un estudio realizado por Ramos *et al.* (2008), al evaluar las temperaturas a las que resisten microorganismos aislados de suelos, se mostró que los microorganismos mesófilos aerobios son viables en temperaturas entre 30 y 35 ° C <sup>63</sup>, siendo este, un rango de temperatura indicador de cepas con características patógenas<sup>64</sup>.

En el presente estudio se realizó una comparación del desarrollo de plantas de papa, en condiciones de invernadero, sin la adición extra de nitrógeno o fosforo soluble al suelo, suplementadas con las cepas seleccionadas (QA8, QA23, QA 44 y R11) y con una cepa reconocida como PGPR, *Bacillus pumilus* ATCC 14884, especie que se ha reportado como potencial promotor de crecimiento vegetal ya que comprende características como la

tolerancia a metales pesados, producción de fitohormonas, resistencia a estrés térmico ambiental y formación de biopelículas<sup>32</sup>.

Las cepas usadas en este trabajo de investigación fueron identificadas molecularmente como: QA8 *Bacillus simplex*, QA23 *Pseudomonas poae*, QA44 *Pseudomonas fluorescens* y la cepa R11 que se identificó como una levadura, *Apiotrichum porosum*; estas especies son propias del ambiente del suelo.

Diferentes estudios demuestran que especies como las identificadas en esta investigación tienen potencial PGPR, tanto por tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico como por solubilizar fosfato inorgánico. Según Holguín *et al.*<sup>5</sup> la fijación de nitrógeno en organismos aislados del suelo no solo es una característica de las bacterias del género *Azospirillum*, sino también de otros microorganismos de la rizósfera. Algunas de ellas son endófitas y tienen distintas capacidades, los géneros más conocidos según una gran cantidad de estudios son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratía*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Acetobacter* y *Azotobacter*<sup>63</sup>, y algunas no tan conocidas como las actinobacterias como los géneros *Arthrobacter*, *Agromyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Propionibacteria* y *Streptomyces*, todas estas con capacidad de fijación de nitrógeno. Esto también es válido para *Frankia* que fija nitrógeno tanto en condiciones de vida libre como simbióticas<sup>64</sup>. Así mismo, Orozco y Martínez (2009) aislaron cepas microbianas fijadoras de nitrógeno, entre estas, especies de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* provenientes del suelo de *Pinus patula*, llegando a la conclusión que al inocular bacterias con esta capacidad se estimula el crecimiento longitudinal y se mejora la nutrición en esta planta<sup>67</sup>.

Así mismo, la caracterización de las cepas capaces de solubilizar fosfatos permite contrastar los planteamientos de Arai *et al.* (2007) con respecto a la solubilización de fosfatos insolubles en el suelo, ya que para los ensayos *in vitro*, la prueba en medio NBRIP-BPB demostró una capacidad innata de las cepas para realizar esta actividad, mostrando así que es posible la descontaminación de fósforo retenido en el suelo por medio de la inoculación de cepas con actividad solubilizadora<sup>75</sup>. Para el caso de este mecanismo, cabe resaltar que las especies bacterianas más reconocidas que poseen esta cualidad son *Bacillus sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium sp.*, *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter aerogenes* y *Streptomyces sp.*, entre otros. El fósforo (P) es uno de los 17 nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, este se incorpora a compuestos

orgánicos como ácidos nucleicos (ADN y ARN), fosfoproteínas, fosfolípidos, enzimas, entre otros<sup>68</sup>.

Por otra parte, el P juega un papel de vital importancia en distintos procesos energéticos como el transporte de nutrientes a través de la planta y metabólicos como la fotosíntesis, este nutriente es absorbido por las raíces y gracias a eso permite la elongación de estas; también estimula la formación de semillas y da vigor a las plantas<sup>69</sup>. Beltrán (2014) evaluó la capacidad como solubilizadoras de fosfatos de 21, empleando *P. fluorescens* (IBUN Pfl095) como control, obteniendo un halo de solubilización con un diámetro de 1,3 mm, el cuál es inferior con respecto al diámetro de la cepa QA44 de este estudio. Los diámetros de las demás cepas aisladas en dicho estudio oscilan entre 1,3 mm y 9,3 mm, en su mayoría, inferiores con respecto a las cepas manejada en este estudio<sup>30</sup>.

Con relación a la producción de fitohormonas, muchos de los microorganismos considerados PGPR tienen la capacidad de producir auxinas como AIA, que benefician a la planta mediante la formación y elongación de la raíz, y muchas de las bacterias producen esta auxina, tanto en ausencia como en presencia de L-triptófano. Un claro ejemplo de esto es *P. fluorescens* productora de esta fitohormona en presencia de L-triptófano<sup>70</sup>.

En la presente investigación, se evaluó la producción de AIA por parte de dos cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, las cepas QA44 y QA23, con concentraciones de AIA de 61,07  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 90,92  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, siendo los resultados más altos con respecto a la cepa control ATCC 14884 (30,61  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), y las cepas R11(12,58  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y QA8 (17,55  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Un estudio realizado por Florez J. (2017)<sup>71</sup>, determinó la concentración de esta auxina en cepas del género *Pseudomonas*, obteniendo concentraciones entre 7,62 y 25,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , concentraciones mucho más bajas con respecto a las obtenidas con las cepas QA44 y QA23. Otro estudio realizado por Deepak y Satyavir<sup>72</sup>, mostró la cantidad significativa de AIA que producen cepas de este mismo género, aisladas de rizósfera de *Cicer arietinum* L y *Vigna radiata*, que crecieron en caldo LB suplementado con L-triptófano, obteniendo valores que oscilaban entre 10,2 a 31,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , los cuales aumentaron conforme pasaban los días de incubación bacteriana, teniendo valores entre 22,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 40,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de IAA posteriores a 4 días de incubación, sin embargo siguen siendo inferiores con respecto a las concentraciones obtenidas con las cepas QA44 y QA23 a las cuales se les determinó la producción de esta auxina igualmente, luego de 4 días de incubación.

Las bacterias del género *Bacillus sp.* son ampliamente reconocidas como PGPR, además de ser productoras de fitohormonas, sideróforos y auxinas, en esta investigación fue posible determinar que la cantidad en ppm (partes por millón) de AIA producida por la cepa QA8 correspondiente a *Bacillus simplex*, fue de 17,55 ppm, lo que en comparación con los datos del estudio realizado por Hassen A y Labuschagne en 2010<sup>55</sup>, quienes determinaron que para un aislado de esta misma especie, la producción de AIA fue de 28,0 ppm, producción significativamente alta con respecto a la cepa aislada en este estudio, sin embargo, en otro estudio realizado por Zuñiga O <sup>73</sup>, en donde de acuerdo a las determinaciones realizada para la cepa de *Bacillus pumilus*, esta bacteria produce concentraciones entre 11,595 y 19,048 ppm de AIA, lo que en comparación con la cepa control ATCC 14884 de *Bacillus pumilus*, usada en la presente investigación es de un valor significativamente inferior, pues la determinación en ppm de la cepa ATCC fue igual a 30,61ppm.

Por último, la cepa R11 correspondiente a la levadura *Apiotrichum porosum*, obtuvo la concentración más baja de AIA con respecto a las otras 4 cepas en estudio, pues fue de 12,58 ppm; Pei-Feng S. *et al.* <sup>74</sup>, indican que tanto las bacterias como los hongos y levaduras tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, y al ser productores de AIA pueden llegar a ser potenciales biofertilizantes. En este estudio evalúan la producción de AIA en 12 cepas de levadura, como las de las especies *Aureobasidium pullulans* con concentraciones de AIA de  $147,4 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$ , *Sporisorium reilianum* produjo  $32,6 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$ , y *Cryptococcus flavus* que produjo IAA en un rango de  $38,6 \pm 1,7$  a  $103,9 \pm 21,2 \mu\text{g/mL}$ , las cuales fueron significativamente superiores con respecto a la cepa R11.

Un proceso de antagonismo se hubiese evidenciado por medio de zonas sin crecimiento o halos de inhibición alrededor de los sensidiscos impregnados con cada cepa; por el contrario, al crecer todas en conjunto, es posible que exista interacción natural entre ellas de forma sinérgica y beneficiosa para la planta.

De las interacciones obtenidas es preciso decir que las cuatro cepas estudiadas en esta investigación comparten una relación sinérgica propia de muchos microorganismos en asociaciones ecológicas, principalmente en la rizosfera del suelo, en este sinergismo es propio hablar de una cooperación por distribución equitativa de nutrientes, por lo que es preciso citar entonces que dicha relación es de gran importancia ya que, las plantas y los microorganismos han co-evolucionado desarrollando diferentes tipos de interacciones, las cuales abarcan las

antagónicas, las neutras y las sinérgicas. Dentro de estas últimas existen distintos grados de asociación, tales como las interacciones a nivel de la rizósfera, con bacterias endófitas o la más estudiada interacción endosimbiótica rizobio-leguminosa. Como resultado de las interacciones sinérgicas, los microorganismos pueden ofrecer ventajas al desarrollo de las plantas, promoviendo su crecimiento como lo menciona Ferrari en 2007 <sup>47</sup>.

Es importante la evaluación de patogenicidad en semillas, pues la mayoría de los cultivos se realizan a partir de estas. Los patógenos en semillas traen consecuencias graves a nivel productivo, y por supuesto a nivel epidemiológico, pues las bacterias tienen la capacidad de penetrar las membranas de las semillas y quedarse allí, para luego causar infección en la planta, o simplemente producen infección superficial. En el caso de la papa y el tomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* es un claro ejemplo de infección a nivel sistémico (Navarrete *et al.*, 2014) <sup>77</sup>. Otros ejemplos son el marchitamiento bacteriano causado por *Pseudomonas solanacearum* o algunas enfermedades fúngicas como moho gris causado por *Botrytis cinerea*, observados en el norte de Uruguay en zonas en donde hubo cultivos previos de papa (Bernal, 2010) <sup>78</sup>.

En este caso no se evidencia daño alguno en la raíz de las semillas después de 15 días de crecimiento, sin embargo, Moreno *et al.*, (2018) señalan que la colonización de las semillas por parte de las bacterias contribuye al control de patógenos, pues crean una biopelícula protectora, estimulando el crecimiento vegetal, y a su vez el sistema inmunitario de la planta, pues están en contacto directo con la raíz de las mismas <sup>79</sup>.

El análisis del suelo usado en los ensayos (Anexo 13) demuestra la presencia de nitrógeno mineralizado (88,8 ppm), el cual se genera a partir de la materia orgánica del suelo, pero este no es directamente asimilable por las plantas; igualmente, hay nitrógeno en forma de amonio (65,6 ppm) que en ocasiones es ligeramente asimilable, y nitrógeno en forma de nitrato (23,2 ppm) que es la forma en que las plantas asimilan mejor el nitrógeno. Tanto el nitrógeno mineral como el amonio sufren procesos de mineralización gracias a condiciones atmosféricas, pero principalmente por acción de microorganismos del suelo que los convierten en nitratos.

Si se hace una comparación con la dosificación propuesta por una casa comercial (Yara Colombia S.A.) para cultivo de papa (Anexo 12), se puede observar que la concentración de nitrógeno en el suelo del ensayo es superior (8,7% más), pero teniendo en cuenta que los

productos comerciales no tienen nitrógeno mineralizado. Y más alta aún que la dosificación propuesta por el Instituto Colombiano Agropecuario, resultado de diferentes experimentos con papa (219,68% más). Al realizar la comparación con la solución nutritiva de Hoagland cuya fórmula determina la aplicación de 210 ppm de nitrógeno, que equivaldrían a 756 kg/ha, es incluso mayor al nitrógeno presente en las muestras de suelo del ensayo (136,5% más), pero cabe destacar que la formulación Hoagland es generalmente utilizada para cultivos hidropónicos y ensayos de laboratorio, mas no para aplicación en campo.

El nitrógeno contribuye al desarrollo vegetativo, con lo cual se esperaría que, a mayor cantidad de este elemento en forma asimilable en el suelo, las plantas adquieran mayor masa vegetal, principalmente en la parte aérea, hecho que es evidente en los resultados presentados en la tabla No. 10, donde se puede observar que hay mejor desarrollo vegetativo con el control solución nutritiva Hoagland completa con respecto a los tratamientos con las cepas seleccionadas e incluso con la cepa PGPR. Sin embargo, la diferencia de desarrollo de la parte aérea es ligeramente inferior con la cepa ATCC 14884 y con el co-inóculo, seguida con valores cercanos por el efecto de las cepas QA44, R11 y QA8, mientras que con la cepa QA23 la ganancia de masa vegetal aérea es muy inferior con respecto al control. Con base en estas observaciones, se puede inferir que la cepa ATCC 14884, el co-inóculo y las cepas QA44 y R11 podrían estar contribuyendo a la mineralización del nitrógeno presente en el suelo o a la fijación de nitrógeno atmosférico, contribuyendo así a un buen desarrollo vegetativo de las plantas de papa<sup>48</sup>.

Con respecto al fósforo, según el informe de fertilidad, este se encuentra en una concentración óptima en el suelo en el que se realizaron los ensayos (109,8 kg/ha) pero no se conoce si este está en forma asimilable para las plantas. Sin embargo, esta concentración de fósforo es muy inferior a las dosificaciones sugeridas por la casa comercial (67% menos) o por el ICA (70,93% menos). Con respecto a la solución de Hoagland, su formulación indica la aplicación de 31 ppm, que corresponderían a 111,6 kg/ha, valor más cercano al del fósforo presente en el suelo, pero se debe considerar que para el tratamiento T2 se adicionó 5,0 gr. de fosfato tricálcico por materia.

El fósforo contribuye a los procesos energéticos de las plantas, principalmente en los primeros estadios de estas, así como para el crecimiento de la raíz y la formación de

tubérculos. Cuando hay deficiencia de fósforo disponible en el suelo, las raíces y los estolones tienen tamaños reducidos<sup>48</sup>.

En cuanto al ensayo realizado en suelo estéril, las características descritas por deficiencia de fósforo no se observaron en la parte aérea de las plantas de papa (Tabla 11), aunque si se observó menor desarrollo con respecto al tratamiento con la solución Hoagland completa, incluso con la cepa control ATCC 14884, sin embargo, en relación al desarrollo de la raíz, se destaca la masa vegetal adquirida con la cepa control, seguida de la cepa QA44, lo que sugiere que estas dos cepas pueden estar facilitando la solubilización de fosfatos inorgánicos, permitiendo así un mejor desarrollo de las raíces en estados tempranos de desarrollo de las plantas de papa.

La adquisición de masa vegetal con el tratamiento T2 muestra que la raíz se desarrolla mucho mejor con la aplicación de la cepa ATCC 14884 seguida por la cepa QA44 con respecto al control Hoagland solución completa, mientras que la parte aérea parece desarrollarse mejor con las cepas QA44 y QA23. Las plantas presentan mayor ganancia de masa vegetal de raíz con el tratamiento T2 con las cepas ATCC 14884 y QA44 con respecto a T1, y menor desarrollo con la cepa R11. Con relación a la parte aérea, sobresale el desarrollo generado con la cepa QA44, seguida por la cepa QA23, mientras que con el co-inóculo y la cepa ATCC 14884 es muy inferior el desarrollo vegetativo con el tratamiento T2 comparado a T1, lo que sugiere que las cepas seleccionadas pueden tener rasgos que permiten una mayor disponibilidad del fósforo presente en el suelo para que las plantas lo puedan asimilar. Cabe destacar la eficiencia de la cepa QA44 en cuanto a la ganancia de masa vegetal tanto en raíz como en parte aérea respecto al control con adición de solución Hoagland completa

En ausencia de suplemento con nitrógeno al suelo, la masa vegetal obtenida por las plantas es cercanamente similar a la adquirida con la cepa control ATCC 14884, y las cepas de estudio QA8, QA44 y R11 respectivamente, mientras que, con el suelo suplementado con fósforo insoluble, la cepa QA44 presenta mejor resultado frente a la cepa control, teniendo en cuenta la masa vegetal adquirida tanto en raíz como en la parte aérea.

Cabe mencionar que, el efecto de adquisición de masa vegetal que se observa en las raíces de las plantas tratadas con la cepa QA8 (129,4%) no parece estar correlacionada con la obtención de masa vegetal en la parte aérea (-11,0%) en el tratamiento T1 (sin adición de nitrógeno extra), sin embargo, al realizar el análisis con respecto a la masa adquirida en raíz

con el tratamiento T2 (sin adición de P soluble) se puede observar que la diferencia es ligeramente inferior respecto al control con solución nutritiva completa (-3,8%), y mucho menor si se compara con la cepa ATCC 14884 (-36,99%).

Los microorganismos seleccionados mostraron un comportamiento variado relacionado con su efecto sobre el crecimiento de las plantas de papa, representado por la ganancia de masa vegetal; en general, mostraron rendimientos inferiores a los observados con la cepa de control *B. pumilus* ATCC 14884, que parece proporcionar principalmente un buen desarrollo radicular a las plantas de papa. Las cepas QA23, R11 y el co-inóculo, tienen una baja eficiencia en cuanto a mejorar la disponibilidad del nitrógeno o el fósforo en el suelo, mientras que la cepa QA8 proporciona principalmente un buen desarrollo radicular, y con la cepa QA44 se observó un comportamiento similar al control con la solución nutritiva completa más las cepas, lo que permite inferir que contribuye a la movilización de nutrientes como nitrógeno o fosforo en el suelo, de modo tal que estos puedan transformarse en especies químicas asimilables por las plantas de papa.

En un estudio realizado por Pathak *et al.*, en 2019 evaluaron el efecto de PGPR y hongos micorrizales en plantas de papa en donde se aislaron un total de 300 bacterias de la rizófora en 3 diferentes variedades de papa, en el estudio se encontró que la inoculación de bacterias diazotróficas nativas y Hongos de la micorriza pueden aumentar el crecimiento de plántulas de papa, los aislamientos hallados en dicha investigación incluyen bacterias del género *Azotobacter*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *B. subtilis* y *Pseudomonas brassicacearum*, y hongos de género *Glomus sp*, aislados que se usaron como inoculas PGPR en ensayos in vitro, durante el desarrollo del estudio, se encontró que las cepas son capaces de realizar algunos mecanismos como solubilización fosfato y producción AIA. Se obtuvo un rendimiento positivo por parte de las PGPR, pues incrementó la altura de la planta de variedad Kufri sindhuri ( $29,7 \pm 1,9$  gr, control:  $20,28 \pm 0,8$  gr), al inocular *Glomus intraradices* + *Bacillus subtilis* (PB3), en las otras dos variedades llamadas Kufri chipsona-3 ( $25.52 \pm 1.2$  gr, control:  $17.19 \pm 1.2$  gr) y Kufri lauvkar ( $24.13 \pm 1.2$  gr, control:  $18.02 \pm 0.9$  gr), este parámetro se ve aumentado con el inóculo de *Glomus intraradices* + *Bacillus subtilis*(PB12). *Glomus intraradices* + *Lysinibacillus boronitolerans* (PB 10) mostró la mayor longitud de raíz en la variedad Kufri sindhuri ( $14.54 \pm 0.6$  gr, control:  $9.84 \pm 0.6$  gr) y Kufri chipsona-3 ( $13.47 \pm 0.5$  gr, control:  $9.22 \pm 0.6$  gr), en Kufri lauvkar ( $13.94 \pm 0.8$  gr, control:  $8.46 \pm 0.2$  gr) fue *Glomus intraradices* + *Bacillus subtilis*(PB 12)<sup>80</sup>.

Las cuatro especies (R11, QA44, QA 8, QA23) exhiben una serie de características aptas para su implementación como PGPR u otras aplicaciones medioambientales.

Dawwam *et al.*, en 2013, señalan en su estudio que todos los aislamientos bacterianos que obtuvieron a partir de raíces de plantas de papa, fueron capaces de aumentar los parámetros evaluados en las plantas, tales como peso seco y peso fresco aislaron 7 cepas bacterianas, las cuales obtuvieron un mejor rendimiento en ciertos parámetros con respecto al control, el peso fresco de las plantas se encontró entre 5,2 g y 7,6 g mientras que la planta control pesó 2,9 g; en cuanto al peso seco, en la planta control fue de 0,041 g, y en las demás plantas está entre 0,047 g y 0,083 g<sup>31</sup>.

Las levaduras son un grupo de hongos polifiléticos que pertenecen a la familia *Ascomycota* y *Basidiomycota*, muchas de ellas son habitantes comunes del suelo, los géneros comúnmente aislados de ecosistemas agrícolas son *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium* y *Williopsis*<sup>49</sup>. Algunas de las funciones de las levaduras del suelo comprenden la descomposición de la materia orgánica, promoción del crecimiento radicular, agregación del suelo, solubilización de fosfato y en algunos casos el biocontrol de los patógenos de las raíces. Además, se ha reconocido la capacidad promotora de crecimiento en levaduras endófitas por medio de la producción de auxinas como el ácido Indol acético<sup>50</sup>. Diversidad de estudios han propuesto experimentos basados en los beneficios evidentes que proporcionan las levaduras a las plantas mediante mecanismos de fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y auxinas. Nassar A., *et al.*, (2005) logró aislar la levadura *Williopsis saturnus* de la raíz de plantas de maíz que fue capaz de producir ácido indol-3-acético y aumentar el peso seco de las raíces<sup>50</sup>. Sarabia M *et al.*, realizó aislamientos de la rizósfera del suelo para evaluar diferentes características en levaduras, encontrando algunas como *Candida railenensis*, *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus flavus*, *Filobasidium globisporum*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Solicoccozyma aerea*, *Symmetrospora coprosmae*, cepas que tras un ensayo en medio NBRIP mostraron solubilización positiva de fosfatos<sup>49</sup>. Además este tipo de microorganismos ha sido probado en cultivos de arroz y plantas carnívoras, mostrando resultados positivos respecto a hongos de tipo micorriza<sup>51</sup>. También Ignatova L., *et al.*, (2015) realizó un aislamiento de 538 cepas de levadura de las cuales 77 lograron demostrar tener la capacidad para producción de AIA, cepas que fueron probadas como promotoras de crecimiento, mostrando actividad promotora

del crecimiento a partir de las células (biomasa) y se observó que el estímulo de la levadura podría detectarse en las primeras etapas de la planta<sup>52</sup>. Lo que, en contraste, permite relacionar la cepa aislada R11 (*Apiotrichum porosum*) ya que además de contar con la capacidad de producción de AIA en bajas concentraciones.

El Género de levadura *Apiotrichum*, está descrito como basidiomiceto anamórfico, a él pertenecen diferentes especies como *Apiotrichum dulcitum*, *A. laibachii* y *A. loubieri*, asociadas al suelo, y algunas otras de importancia clínica como *Apiotrichum domesticum* y *A. montevideense* asociadas a neumonitis por hipersensibilidad humana de verano. *Apiotrichum porosum*, es otra especie que hace parte de este género, pero relativamente poco estudiada, que comparte gran similitud genética con el género *Trichosporon*. *Apiotrichum porosum* fue aislado originalmente en suelo, en Hamburgo, Alemania. Tiene la capacidad de formar micelios de tipo arthroconidos<sup>53</sup>.

Sin embargo, no se encontraron registros bibliográficos que hablen acerca de patogenicidad de *A. porosum* en humanos, tampoco se encuentran registros sobre este género asociados a promoción de crecimiento vegetal.

Las bacterias del género *Bacillus sp.* son conocidas como potenciales promotores de crecimiento en plantas, sin embargo, la especie *B. simplex* no ha sido ampliamente reconocido como cepa PGPR, algunos estudios han revelado que al ser evaluado en conjunto con otras cepas, tiene la capacidad de potenciar la formación de tubérculos, producir sideróforos y solubilizar fosfatos, además ha demostrado tener actividad anti fúngica hacia *Fusarium*<sup>54</sup>. Así mismo, algunos estudios han revelado que ciertas cepas de *B. simplex* promueven el crecimiento de kiwi, tomate y trigo, pero pocos estudios describen esta bacteria como PGPR<sup>55</sup>.

Sin embargo, Hassen y Labuschagne . mencionan dentro de su investigación que *Bacillus simplex* aislado del rizoplaneo, es capaz de colonizar la raíz de plantas de tomate y trigo y mostrar resultados positivos en el aumento de masa vegetal y calidad del grano en plantas de maíz, además de aumentar el peso seco de la raíz y producir una concentración deseable de Ácido Indol acético, promoviendo en gran medida el crecimiento en estas dos plantas<sup>56</sup>. Además de esto, tiene capacidad reductora de químicos en el suelo, en un casi 94% como lo mencionan Erguven G y Yildirim N, en donde se encontró que fue capaz de ejercer un efecto biorremediador en suelos contaminados con clorsulfuron<sup>57</sup>.

Por otra parte, Celandroni *et al.*<sup>58</sup> revelan que las cepas de *B. simplex* no son potenciales patógenos humanas, a pesar de ser resistente a la penicilina, es una cepa susceptible a muchos otros antibióticos y también es aislada con muy mínima frecuencia en pacientes con alguna infección de tipo bacteriano.

*Pseudomonas* sp. es un género de bacilos Gram negativos, aerobios, no fermentadores de glucosa, asociado a infecciones en el ser humano por parte de algunas especies<sup>59</sup>. Este género se encuentra en distintos ambientes naturales, especialmente en la rizósfera, cumpliendo funciones de biorremediación, control biológico y promoción de crecimiento vegetal<sup>60</sup>.

Se ha demostrado que este género es capaz de aumentar la longitud de las raíces en las plantas, al igual que la masa vegetal, esto se ve reflejado en el peso fresco. Otra característica importante es su cualidad como controlador biológico por medio de dos mecanismos: producción de compuestos antimicrobianos y competencia. Dentro de las especies más conocidas como promotoras de crecimiento vegetal es posible encontrar *Pseudomonas fluorescens*, quienes tienen la capacidad de colonizar la rizósfera, y la semilla de la planta, formando así una capa protectora en la raíz, además tiene una alta capacidad de unión al hierro<sup>61</sup>.

## 8. CONCLUSIONES

- A partir de suelos naturales poco intervenidos de rizosfera y raíz de papa se aislaron 95 cepas, de las cuales se seleccionaron inicialmente 22 para los estudios de promoción del crecimiento vegetal.
- De las 22 cepas microbianas, se seleccionaron tres cepas bacterianas (QA8, QA23 y QA44) y una levadura (R11), que en condiciones de laboratorio, demostraron capacidad para mineralizar el nitrógeno, solubilizar fósforo inorgánico y producir fitohormonas tipo ácido indol acético.
- Las cepas estudiadas fueron identificadas molecularmente como QA8 *Bacillus simplex*, QA23 *Pseudomonas poae*, QA44 *Pseudomonas fluorescens* y R11 *Apiotrichum porosum*.

- Las cepas QA44, QA8 y QA23 demuestran una rápida mineralización del nitrógeno, así como solubilización de fosfato de forma eficiente en condiciones *in vitro*.
- Las cepas QA23 y QA44 producen mayor cantidad de ácido indol acético, con respecto a la cepa control *B. pumilus* ATCC 14884, en condiciones *in vitro*.
- Ninguna de las cuatro cepas estudiadas ocasiona efectos nocivos sobre semillas de tomate y permiten su germinación.
- Las cepas QA23 y R11, y el co-inóculo tienen una baja eficiencia en cuanto a mejorar la disponibilidad del nitrógeno o el fósforo en el suelo.
- La cepa QA8 proporciona principalmente un buen desarrollo radicular de las plantas de papa, al igual que la cepa control *B. pumilus* ATCC 14884.
- La cepa QA44 *P. fluorescens* permite la adquisición de masa vegetal similar en suelos sin adición de nitrógeno o de fósforo soluble, similar a la que las plantas adquieren con una solución nutritiva completa.

## 9. RECOMENDACIONES

Los resultados preliminares demuestran que 3 de las cepas estudiadas (QA8, QA23 y QA44) presentan rasgos que inducen a realizar estudios más amplios con estas, para determinar si verdaderamente son rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Dentro de estos estudios proponemos ensayos con sustrato inerte con dosificación de nutrientes más controlada, de modo que permita ver si efectivamente contribuyen a convertir el nitrógeno y el fósforo en formas más asimilables por las plantas de papa. Así mismo, consideramos importante determinar los factores que inducen a estas cepas a producir auxinas, y si estas fitohormonas tienen la capacidad de ejercer un efecto directo sobre el desarrollo de las plantas de papa.

Por otra parte, se ha de tener en cuenta que en condiciones naturales los microorganismos sufren la influencia de diversos factores ambientales, químicos y biológicos, ejercidos por la

presencia de otros microorganismos de la rizósfera, por lo cual, se deben realizar ensayos en campo para determinar la acción de las cepas seleccionadas. Así como determinar la dosificación más adecuada para la inoculación del suelo con estas cepas.

Con respecto a la cepa R11, si bien no presentó un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas de papa, si es importante determinar que aplicaciones puede tener este microorganismo y enfocar estudios futuros a su posible aprovechamiento biotecnológico.

Es importante realizar los ensayos en suelo, adicionando un control sin microorganismos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Efrén Venancio RC, Bonilla B, Aguilar M. Interacciones entre Plantas y Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal. Revista CITECSA [Internet] 2018 [Citado el 4 de abril de 2019];10(15):23-31. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/results/4FAB91BC570148BAPQ/1?accountid=50438>
2. Patiño E, Jaramillo S, González L, Cortés J. Respuesta de la papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad DIACOL Capiro a la fertilización en un andisol del oriente Antioqueño, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín [Internet] 2009 [Citado el 4 de abril de 2019];62(2):5099-5110. <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/results/4FAB91BC570148BAPQ/1?accountid=50438>
- 3 Arango M, Puentes A. Frutos que nos conectan con nuestro indígena interior. EL TIEMPO [Internet]. 2018 [citado el 7 Abril de 2019];. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/docview/2125575062/AF5568A7735747B6PQ/1?accountid=504384>.
4. Mehta S, Nautiyal C. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. Current Microbiology. 2001;43(1):51-56.
5. Holguin G, Bashan Y, Puente E, Carrillo A, Bethlenfalvay G, Rojas A et al. PLANT GROWTH PROMOTION BY RHIZOSPHERE BACTERIA [Internet]. CIBNOR 2003; 29(2): 201-211 [citado 25 sept 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/237037240\\_Promocion\\_del\\_crecimiento\\_en\\_plantas\\_por\\_bacterias\\_de\\_la\\_rizosfera](https://www.researchgate.net/publication/237037240_Promocion_del_crecimiento_en_plantas_por_bacterias_de_la_rizosfera)
6. Osorio N. a review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. Scielo. 2007 [Citado 27 sep 2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472007000100001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472007000100001)
7. Jafra S, Przysowa J, Czajkowski R, Michta A, Garbeva P, Van der Wolf J. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine

lactone. Canadian Journal of Microbiology. 2006;52(10):1006-1015.[Citado 25 sep 2018]. Disponible en: [http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w06-062?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w06-062?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

8. Kumar R , Bhatia R , Kukreja K , Behl RK , Dudeja SS , Narula N . Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.).Journal of Basic Microbiology. 2007;46(5): 436-439 [Citado 27 sep 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jobm.200610285>

9. Choudhary D, Johri B. Interacciones de *Bacillus* spp. y plantas - con especial referencia a la resistencia sistémica inducida (ISR).[Internet]. Microbiological Research. 2009;164(5):493-513.[citado 27 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845426>

10. Maldonado E, Rivera M, Izquierdo F, Palma D. Efectos de rizófora, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado [Internet]. Scielo.org.mx. 2010 [Citado 27 sep 2018]. Disponible en : [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792010000200001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000200001)

11. Valenzuela, et al. La inoculación de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) con *Bacillus subtilis* estimula el crecimiento de la mosca blanca desarrollo de *Bemisia tabaci* [Internet]. Planta 2010 231: 397. [Citado 2 oct 2018]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-009-1061-9>

12. Patiño C. Solubilización de Fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia [Trabajo de grado de doctorado en Ciencias Agropecuarias] Palmira: Universidad Nacional de Colombia de Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2010 Disponible en : <http://www.bdigital.unal.edu.co/3639/1/9175001.2010.pdf>

13. Krysiak D, et al. Participación de múltiples loci en la extinción del quórum de las moléculas de autoinductor I en la fijación de nitrógeno *Symbiont Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. Cepa NGR234 [ Internet]. Appl Environ Microbiol 2011 77 (15): 5089–5099. [Citado 5 nov 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147472/>

14. Shrivastava U, et al. Un ensayo simple y rápido en placa para la detección de microorganismos productores de ácido indol-3-acético (IAA) [Internet]. *Revista Internacional de Biología Aplicada y Tecnología Farmacéutica* 2011 2: 120-123 [Citado 4 nov 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/236176855\\_A\\_Simple\\_and\\_Rapid\\_Plate\\_Assay\\_for\\_the\\_Screening\\_of\\_Indole-3-acetic\\_Acid\\_IAA\\_Producing\\_Microorganisms](https://www.researchgate.net/publication/236176855_A_Simple_and_Rapid_Plate_Assay_for_the_Screening_of_Indole-3-acetic_Acid_IAA_Producing_Microorganisms)
15. Sánchez D, Gómez R, Garrido M, Bonilla R. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero [Internet]. *SciELO.org.mx*. 2012 [citado el 25 de enero de 2019]. Disponible en : [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342012000700009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000700009)
16. Sellstedt A, Richau K. Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. [Internet]. *FEMS Microbiology Letters*. 2013 342 (2): 179–186 [citado el 25 Enero de 2019]. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/342/2/179/514300>
17. Moreno L, Galvis F. Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofias aisladas de muestras de suelo rizosférico [Internet]. 2013 [citado 20 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269127587003>
18. Fukami J, Cerezini P, Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation [Internet]. 2018 [cited 9 March 2019]. Available from: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-018-0608-1>
19. Leveratto C. El cultivo de papa [Internet]. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2015 [citado el 5 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://inta.gob.ar/noticias/el-cultivo-de-papa>
20. Cárdenas Pinzó J, Vallejo Zamudio L. Agricultura y desarrollo rural en Colombia 2011-2013: una aproximación Artículo barra lateral. *Apuntes del CENES* [Internet]. 2016 35 (62): 87-123. [citado el 20 de mayo de 2019]; Disponible en: <https://revistas.uptc.edu.co/index.php/cenes/article/view/4411>
21. FAO, FIDA, UNICEF, PMA y OMS. 2018. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad

alimentaria y la nutrición. FAO [Internet]. Roma; 2018 [cited 5 September 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9553ES/i9553es.pdf>

22. Pérez J. Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola [Internet]. 2014 [citado el 11 Octubre 2019]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/39459/1/71782231.2014.pdf>

23. Informe de gestión anual [Internet]. 2015 [citado el 11 Octubre de 2019]. Disponible en: <https://fedepapa.com/wp-content/uploads/2017/01/INFORME-DE-GESTION-FNFP-ANUAL-2015.pdf>

24. Martínez Mojica ZN. identificación de alteraciones del suelo por la actividad agrícola debido a su uso inadecuado y la utilización de agroquímicos en la vereda de Siatame municipio de Sogamoso, departamento de Boyacá [Ingeniero]. Universidad Militar Nueva Granda- Facultad de ingeniería; 2015.

25. Chica Toro F. Evaluación de la distribución de zeolitas al suelo como factor para mitigar la contaminación producto de la fertilización agrícola. puerta de la investigación. [Internet]. 2008 [citado 11 Octubre de 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/277152444\\_Evaluacion\\_de\\_la\\_adicion\\_de\\_zeolitas\\_al\\_suelo\\_como\\_factor\\_para\\_mitigar\\_la\\_contaminacion\\_producto\\_de\\_la\\_fertilizacion\\_agricola](https://www.researchgate.net/publication/277152444_Evaluacion_de_la_adicion_de_zeolitas_al_suelo_como_factor_para_mitigar_la_contaminacion_producto_de_la_fertilizacion_agricola)

26. Moreno Pérez R, García Martín T Fertilización y corrección edáfica de suelos agrícolas con productos orgánicos. Revista Ciencia , Tecnol y Medio Ambiente. [Internet]. 2011 [citado 11 de octubre de 2019] 22(2):7-20. Disponible en: <http://www.interempresas.net/Agricultura/Articulos/47082-Fertilizacion-y-correccion-de-suelos-agricolas-con-productos-organicos.html>

27. Gururani M. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Abiotic Stress Tolerance in *Solanum tuberosum* Through Inducing Changes in the Expression of ROS-Scavenging Enzymes and Improved Photosynthetic Performance [Internet]. 2013 [citado 20 May 2019]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-012-9292-6>

28. Becker R, Rokem J. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture

[Internet]. 2018 [cited 11 October 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6206271/>

29. Alvarado, A., Iturriaga, I., Smyth, J., Ureña, M. y Portuguez, E. Efecto de la fertilización con fósforo sobre el rendimiento y la absorción de nutrimentos de la papa en un Andisol de Juan Viñas, Costa Rica Agronomía Costarricense. [Internet] 2009 [cited 6 October 2019];33(1):45-61. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/323969112\\_EFECTO\\_DE\\_LA\\_FERTILIZACION\\_CON\\_FOSFORO\\_SOBRE\\_EL\\_RENDIMIENTO\\_Y\\_LA\\_ABSORCION\\_DE\\_NUTRIMENTOS\\_DE\\_LA\\_PAPA\\_EN\\_UN\\_ANDISOL\\_DE\\_JUAN\\_VINAS\\_COSTA\\_RICA](https://www.researchgate.net/publication/323969112_EFECTO_DE_LA_FERTILIZACION_CON_FOSFORO_SOBRE_EL_RENDIMIENTO_Y_LA_ABSORCION_DE_NUTRIMENTOS_DE_LA_PAPA_EN_UN_ANDISOL_DE_JUAN_VINAS_COSTA_RICA)

30. Beltrán Pineda M. Bacterias solubilizadoras de fosfato con potencial biofertilizante en suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum*). Revista de Agronomía [Internet]. 2014 [citado 6 octubre 2019];22(2):7-20. Disponible en : [http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia22\(2\)\\_2.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia22(2)_2.pdf)

31. Dawam D, Elbeltagy A. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant [Internet]. 2013 [cited 11 October 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178313000298>

32. Etesami H, Maheshwari D. Uso de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) con múltiples rasgos que promueven el crecimiento de las plantas en la agricultura de estrés: mecanismos de acción y perspectivas de futuro. Ecotoxicología y seguridad ambiental [Internet]. 2018 [citado el 12 de noviembre de 2019]; 156 (30): 225-246. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29554608>

33. Etesami H, Emami S, Alikhani H. Bacterias solubilizantes de potasio (KSB): Mecanismos, promoción del crecimiento de las plantas y perspectivas futuras Una revisión. Revista de ciencia del suelo y nutrición vegetal [Internet]. 2017 [citado el 14 de noviembre de 2019]; 17 (4): 897-911. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-95162017000400005](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162017000400005)

34. Alvarado-Capó Y, Leiva M, Cruz M, Mena E. Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la obtención de minitubérculos de papa en casa de cultivo [Internet]. IBP. 2014 [citado el 12 de noviembre de 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/279984611\\_Efecto\\_de\\_bacterias\\_promotoras\\_del\\_c](https://www.researchgate.net/publication/279984611_Efecto_de_bacterias_promotoras_del_c)

recimiento\_vegetal\_en\_la\_obtencion\_de\_minutuberculos\_de\_papa\_en\_casa\_de\_cultivo\_Effect\_of\_plant\_growth\_promoting\_bacteria\_onuber\_obterato\_onuber\_influte\_onuber\_fuerte\_de\_bacteria\_onuberia\_de\_bacterias\_de\_bacterias.

35. Ramos, B., Lucas García, J.A., Probanza, A, Domenech, J, & Gutierrez-Mañero, J. Influence of an indigenous European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) rhizobacterium (*Bacillus pumilus*) on the growth of alder and its rhizosphere microbial community structure in two soils. *New Forests* 25, 149–159 (2003). <https://doi.org/10.1023/A:1022688020897>

36. Mau, S., Vega, K. and Araya, M. Aislamiento De Bacterias Del Suelo Y Su Potencial Utilización En Sistemas De Tratamiento De Aguas Residuales. [Internet] 2011 [Citado el 13 de Diciembre de 2019] Disponible en: <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/ambientales/article/view/7704>

37. Schoebitz Cid M. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.) [Licenciado en Ciencias Agrarias]. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE; [Citado el 13 de Diciembre de 2019]. 2006 [Internet] Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fas364a/doc/fas364a.pdf>

38. Baldani, J. and Massena, V., 2014. *The Art Of Isolating Nitrogen-Fixing Bacteria From Non-Leguminous Plants Using N-Free Semi-Solid Media: A Practical Guide For Microbiologists*. [online] Available at: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-014-2186-6>> [Accessed 19 March 2019].

39. Shekhar Nautiyal C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [Internet]. 1999 [cited 5 March 2020] Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/170/1/265/454487>

40. Pereira F, Fiore M, Beraldo de Moraes L, Silva-Stenico I M, Scramin S, Teixeira M et al. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4a. *AGRICULTURAL MICROBIOLOGY* [Internet]. 2009 [cited 5 September 2019];66(5):583-592. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/sa/v66n5/02.pdf>

41. EG, Y D. Un examen crítico de la especificidad del reactivo salkowski para compuestos indólicos producidos por bacterias fitopatógenas. [Internet]. 1995 [citado el 9 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16534942>
42. Sarker, A. and Al-Rashid, J., 2013. Analytical Protocol For Determination Of Indole 3 Acetic Acid (IAA) Production By Plant Growth Promoting Bacteria (*PGPB*). [Internet] [Citado el 16 Marzo de 2020]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/263818523\\_Analytical\\_Protocol\\_for\\_determination\\_of\\_Indole\\_3\\_acetic\\_acid\\_IAA\\_production\\_by\\_Plant\\_Growth\\_Promoting\\_Bacteria\\_PGPB?enrichId=rgreq-8cec97adace2741f706f996bcca9ec70-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI2MzgxODUyMztBUzo2MDM1NDk5NjQ2OTc2MDBAMTUyMDkwODkzMzAwNQ%3D%3D&el=1\\_x\\_3&\\_esc=publicationCoverPdf](https://www.researchgate.net/publication/263818523_Analytical_Protocol_for_determination_of_Indole_3_acetic_acid_IAA_production_by_Plant_Growth_Promoting_Bacteria_PGPB?enrichId=rgreq-8cec97adace2741f706f996bcca9ec70-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI2MzgxODUyMztBUzo2MDM1NDk5NjQ2OTc2MDBAMTUyMDkwODkzMzAwNQ%3D%3D&el=1_x_3&_esc=publicationCoverPdf)
43. Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M. and Schumacher, J., 2019. Analysis Of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production In *Klebsiella* By LC-MS/MS And The Salkowski Method. [online] Bio-protocol.org. [citado el 18 Marzo de 2020]. Disponible en: <https://bio-protocol.org/pdf/bio-protocol3230.pdf>.
44. Universidad Distrital Francisco José de caldas Facultad de Ciencias y educación. Vereda Quiba Alta, Localidad Ciudad Bolívar [Internet]. 2018 [citado el 12 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/15449/1/DuarteFlorezNatalia2019.pdf>
45. García F, Muñoz H, Carreño C, Mendoza G. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque [Internet]. 2010 [cited 4 March 2020]. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/19>
46. Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. Una revisión [Internet]. 2007 [cited 9 March 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n2/v25n2a15.pdf>
47. Ferrari Fructos, E., 2017. *Construcción Y Caracterización De Una Colección De Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal Asociadas Al Cultivo De Canola (Brassica Napus L.) Y El Efecto De Su Inoculación En Cultivos In Vitro.*. [online] Available at:

<<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19134/1/uy24-18815.pdf>>  
[Accessed 16 March 2020].

48. Barrera B. L. FERTILIZACIÓN DE CULTIVOS EN CLIMA FRIO. Bogotá: Ricardo Guerrero Riascos.; 1998.

49. Sarabia M, Cazares S, González-Rodríguez A, Mora F, Carreón-Abud Y, Larsen J. Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. *Rhizosphere* [Internet]. 2018 [citado el 10 de febrero de 2020];6:67-73. Disponible en: <http://www.elsevier.com/locate/rhisph>

50. Nassar A, El-Tarabily K, Sivasithamparam K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* [Internet]. 2005 [citado el 10 de febrero de 2020];42(2):97-108. Disponible en: <https://research-repository.uwa.edu.au/en/publications/promotion-of-plant-growth-by-an-auxin-producing-isolate-of-the-ye>

51. Fu S, Sun P, Lu H, Wei J, Xiao H, Fang W *et al.* Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology* [Internet]. 2016 [citado el 10 de febrero de 2020];120(3):433-448. Disponible en: <https://www.journals.elsevier.com/fungal-biology>

52. Ignatova L, Brazhnikova Y, Berzhanova R, Mukasheva T. Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. *Microbiological Research* [Internet]. 2015 [citado el 15 de Febrero de 2020]; 175:78-83. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131500049X?via%3Dihub>

53. James S, Bond C, Stanley R, Ravella S, Péter G, Dlauchy D *et al.* *Apiotrichum terrigenum* sp. nov., a soil-associated yeast found in both the UK and mainland Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [Internet]. 2016 [citado el 10 de febrero de 2020];66(12):5046-5050. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5244499/>

54. Schwartz AR, Ortiz I, Maymon M, Herbold CW, Fujishige NA, Vijanderan JA, *et al.* *Bacillus simplex*-A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity-Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum*

bv. viciae. *Agronomy* [internet].2013 [citado el 14 de diciembre de 2019]; 3(4):595-620. Disponible en: <http://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2091/10.3390/agronomy3040595>

55.Choudhary D, BN J. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants—With SPECIAL reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res* [Internet]. 2009 [citado el 14 de diciembre de 2019]; 164:493–513. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845426>

56. Hassen AI, Labuschagne N. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [internet].2010[citado el 14 de diciembre de 2019] 10;26(10):1837-1846. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-010-0365-z>

57. Erguven G, Yildirim N. Efficiency of some soil bacteria for chemical oxygen demand reduction of synthetic chlorsulfuron solutions under agiated culture conditions. *Cellular and Molecular Biology* [Internet]. 2016 citado el 17 de diciembre de 2019];62(6):92-96. Disponible en : <https://cellmolbiol.org/index.php/CMB/article/view/879>

58.Celandroni F, Salvetti S, Gueye S, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi S *et al.* Identification and Pathogenic Potential of Cincical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates. *PLOS ONE* [Internet]. 2016 [citado el 17 de Diciembre de 2019];11(3):e0152831. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816569/>

59. Pinzón A. *Pseudomonas* [Internet]. Scielo.org.co. 2019 [cited 6 March 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v44n1/0120-2448-amc-44-01-52.pdf>

60. Mayz J, Manzi L. Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizófora de *Samanea saman* (Jacq.) Merr [Internet]. Scielo.org.co. 2017 [cited 8 March 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n1/0123-3475-biote-19-01-00029.pdf>

61. Dorjey S, Dolkar D, Sharma R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*: A Review [Internet]. Ijcmas.com. 2017 [cited 7 March 2020]. Disponible en: <https://www.ijcmas.com/6-7-2017/Stanzin%20Dorjey,%20et%20al.pdf>

62. Muñoz Arranz A. antibióticos en el suelo [Licenciado en Farmacología]. Universidad Complutense; 2017.[internet] Disponible en:

<http://147.96.70.122/web/tfg/tfg/memoria/ana%20mu%c3%91oz%20arranz.pdf> [ citado el 12 de Diciembre de 2019]

63. Ramos Vásquez E, Zúñiga Dávila D. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio [Internet]. Scielo.org.pe. 2008 [citado el 16 de febrero de 2020]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162008000100015&script=sci\\_arttext&lng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162008000100015&script=sci_arttext&lng=en)

64. Durán M, Montero Castillo P, Flórez W Higienic-Sanitary Evaluation and Antagonistic Action of Strains of Commercial Lactobacillus in Front to the Pathogen Microorganism (*Escherichia coli*) Present in the cheese of Layer of the Municipality of Mompox. Revista Científica [Internet]. 2010 [citado el 16 de febrero de 2020];10(3):312-317. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95916116014.pdf>

65. Díaz Franco, A. and Mayek Pérez, N., *LA BIOFERTILIZACIÓN COMO TECNOLOGÍA SOSTENIBLE*. [Internet] 2008 [citado el 16 de marzo de 2020].Bashanfoundation.org. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/librobiofertilizacionprol.pdf>

66. Rojas L, Valencia A. caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno y su relación con suelos agrícolas en el distrito de riego de repelón, departamento del atlántico. [ingeniero ambiental]. universidad de la costa; 2018. [internet] Disponible en: <http://repositorio.cuc.edu.co/bitstream/handle/11323/70/1140883533%20%201143153645.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

67. Orozco Jaramillo C, Martínez Nieto P. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia [Internet]. 2009 [cited 8 April 2020]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/250372064\\_Evaluacion\\_de\\_la\\_inoculacion\\_con\\_microorganismos\\_fijadores\\_de\\_nitrogeno\\_asimbioticos\\_aislados\\_de\\_la\\_rizosfera\\_de\\_Pinus\\_patula\\_en\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/250372064_Evaluacion_de_la_inoculacion_con_microorganismos_fijadores_de_nitrogeno_asimbioticos_aislados_de_la_rizosfera_de_Pinus_patula_en_Colombia)

68. Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica [Internet]. Scielo.org.mx. 2020 [citado el 17 de enero de 2020]. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792010000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792010000100007)

69. Síntomas Visuales de Deficiencia de Fósforo en los Cultivos | Intagri S.C. [Internet]. Intagri.com. 2020 [citado el 17 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/sintomas-visuales-de-deficiencia-de-afosforo-en-los-cultivos>
70. Peñafiel-Jaramillo M, Torres-Navarrete E, Barrera-Álvarez A, Prieto-Encalada H, Morante Carriel J, Canchignia-Martínez H. Producción de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid “Thompson seedless” *in vitro* [Internet]. 2016 [cited 9 March 2020]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/321637983> Produccion de acido indol-3-acetico por Pseudomonas veronii R4 y formacion de raices en hojas de vid Thompson seedless in vitro
71. Florez-Márquez J, Leal-Medina G, Ardila-Leal L, Cárdenas-Caro D. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS ASOCIADAS A CULTIVOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) DEL NORTE DE SANTANDER (COLOMBIA) [Internet]. Scielo.org.mx. 2017 [cited 7 March 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n4/1405-3195-agro-51-04-00373.pdf>
72. Malik D, Sindhu corresponding S. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*) [Internet]. 2011 [cited 10 March 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550561/>
73. Zúñiga Bravo O. Crecimiento de *Bacillus pumilus* Productor de la Auxina Ácido Indolacético, Como Base para Formular un Biofertilizante en Polvo [Ingeniero en Alimentos]. Universidad Austral de Chile; 2009.
74. Feng Sun P, Ta Fang W, Ying Shin L, Yu Wei J, Feng Fu S, Yu Chou J. Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant *Drosera indica* L [Internet]. 2014 [cited 10 March 2020]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114196>
75. Arai Y, Sparks DL. Dinámica de la reacción de fosfato en suelos y componentes del suelo: un enfoque multiescala. *Advances in Agronomy* [Internet]. 2007; 94:135-179. [citado

19 sept 2018]. Disponible en :  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211306940036>

76. DG Jones, J. and Dangl, J., 2006. *El Sistema Inmune De La Planta*. [online] Available at:  
<<https://www.nature.com/articles/nature05286>> [Accessed 16 March 2020].

77. Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M., Moya Hernández, S. and González Ochoa, M., 2014. *Bacterias Fitopatógenas En Semillas: Su Detección Y Regulación*. [online] Scielo.org.mx. Available at:  
<[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092014000200075](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200075)>  
[Accessed 16 March 2020].

78. Bernal, R., 2010. *ENFERMEDADES DE TOMATE (Lycopersicum Esculentum Mill.) EN INVERNADERO EN LAS ZONAS DE SALTO Y BELLA UNIÓN*. [online] Inia.uy. Available at:  
<<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429230710110412.pdf>>  
[Accessed 16 March 2020].

79. Moreno, A., García, V., Reyes, J., Arroyo, J. and Cano, P., 2018. *Rizobacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal: Una Alternativa De Biofertilización Para La Agricultura Sustentable*. [online] Scielo.org.co. Available at:  
<<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v20n1/0123-3475-biote-20-01-68.pdf>> [Accessed 16 March 2020].

80. Pathak D, Lone R, Khan S, Kou K. Isolation, screening and molecular characterization of free-living bacteria of potato (*Solanum tuberosum* L.) and their interplay impact on growth and production of potato plant under Mycorrhizal association. *Scientia Horticulturae* [Internet]. 2019 [citado el 20 de febrero de 2020];(252):388-397 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423819301542>

## ANEXOS

### Anexo 1. PROTOCOLO PREPARACIÓN MEDIO NBRIP-BPS (Nautiyal, CS., et. al., 1999)

Adicionar los siguientes reactivos en estricto orden para evitar precipitación de reactivos. Para 1 litro (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP))

- H<sub>2</sub>O-d 800 mL
- Glucosa 10 g
- MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 5 g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 g
- NaCl 0,2 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.25 g
- KCl 0.2 g
- Azul de bromofenol (0,025 mg/mL) 2,5 mL (de stock 10 mg/mL)
- Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 g
- Agar (según casa comercial)
- Ir mezclando los componentes en agitación.
- Completar a 1000 mL
- Ajustar el pH a 7.0
- Esterilizar y servir con el medio caliente, manteniendo el medio en agitación ya que el calcio estará precipitado y debe quedar homogéneo en cada placa.

Incubar a 20 grados. Medir halos el día 5, y luego cada 2 días hasta 14 días.

### Anexo 2. PROTOCOLO PREPARACIÓN MEDIO NFb (Baldani, JI., et. al., 2014)

Adicionar los siguientes reactivos en estricto orden para evitar precipitación de reactivos. Para 1 litro:

- H<sub>2</sub>O-d 800 mL
- Acido málico 5 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g
- NaCl 0,1 g
- CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,02 g
- Solución de micronutrientes 2 mL (ver preparación más adelante)
- Azul de bromotimol (5 g/L) 2 mL (ver preparación más adelante)
- Fe-EDTA (16,4 g/L) 4 mL (ver preparación más adelante)
- Solución de vitaminas 1 mL (ver preparación más adelante)
- KOH 4,5 g
- Completar con agua destilada a 1000 mL.
- Ajustar el pH a 6,5
- Si se requiere medio semisólido agregar 1,6 g a 1,8 g de agar.
- Si se requiere medio sólido agregar 15 g de agar.
- Esterilizar en autoclave.

#### SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES PARA MEDIO NFb

Para 1000 mL de solución, agregar los siguientes reactivos, en el mismo orden expuesto:

- H<sub>2</sub>O-d 800 mL

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,04 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,12 g
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  1,40 g
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,175 g

- Completar a 1000 mL. Esterilizar en autoclave.
- Almacenar a unos 25°C para evitar precipitación.

### SOLUCIÓN DE AZUL DE BROMOTIMOL

Preparar KOH 0,2N y disolver el colorante a una concentración final de 5 gramos por litro.

- Pesar 0,5 g de colorante y disolverlo en 100 mL de KOH 0,2N.
- Almacenar en frasco oscuro.
- Esterilizar en autoclave.

### SOLUCIÓN DE VITAMINAS

- Biotina 10 mg
- Piridoxal HCL 20 mg

Revisar en que se disuelven cada uno de los componentes.

Para 100 mL:

Disolver en baño de agua caliente.

Esterilizar por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ ).

Almacenar en frasco oscuro.

### SOLUCIÓN Fe-EDTA (16,4 g/L) 200 mL

#### 1. Solución EDTA

- Preparar 100 mL de KOH 1N en un vaso de precipitados de al menos 250 mL.
- Colocarlo en la plancha con poco calor.
- Cuando la solución este templada, adicionar 3,28 g de EDTA.
- Agitar hasta que el reactivo se disuelva.

#### 2. HCl 1N

A 50 mL de agua, adicionar 405  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado.

#### 3. Solución Fe

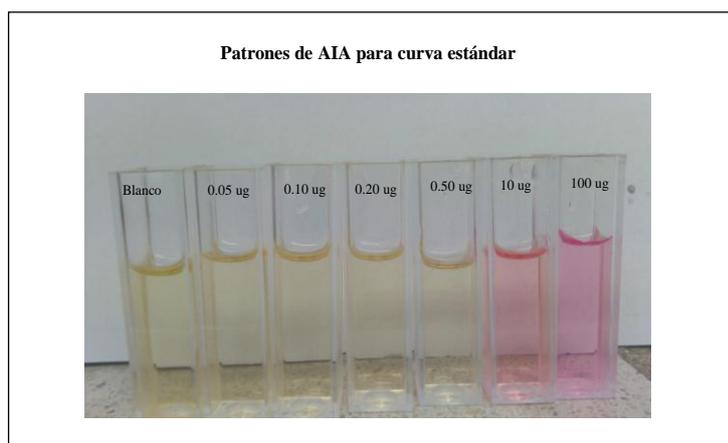
- Preparar 50 mL de HCl 1N (Sol. 2)
- Adicionar 0,4264\* g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Mezclar hasta disolver el reactivo

\*En teoría el EDTA secuestra hasta un 13% de Fe 16,4 g/L de Fe-EDTA total, entonces el 13% ¿cuánto es?

#### 4. Fe-EDTA

- Adicionar 1,33 mL de la solución Fe (3) a la solución EDTA (1) (o hasta generar un color amarillo ocre, sin precipitado)
- Completar a unos 180 mL con agua
- Dejar esta mezcla en agitación y oscuridad unas 12 horas (el pH variará en este tiempo)
- Ajustar el pH a 5,5 (HCl o KOH)

## Anexo 3. PATRONES COLORIMETRICOS DE CONCENTRACIÓN DE AIA



#### **Anexo 4. PROTOCOLO LAVADO DE SEMILLAS DE TOMATE**

1. Se sumergen las semillas a utilizar en hipoclorito al 1% por 60 min cubiertas por el filtro (malla o gasa estéril) para evitar la pérdida de éstas, todo se realiza en cabina de flujo laminar o en mesón limpio junto al mechero.
2. se sumergen en agua destilada estéril para quitar los residuos de hipoclorito.
3. Se pasan por etanol al 70% por 5 minutos.
4. Se realizan tres lavados con agua destilada estéril para eliminar el compuesto químico.
5. Se dejan 15 días en cámara húmeda, es decir en una caja de Petri con un papel absorbente estéril húmedo con agua y previamente sellado.

#### **Anexo 5. PROTOCOLO LAVADO DE CÉLULAS**

1. Dejar en crecimiento por 24 horas en tubos falcon los microorganismos, en caldo LB
2. Centrifugar tubos a 5000 rpm durante 10 minutos
3. Sacar sobrenadante.
4. Adicionar 1m de NaCl 0,9% y resuspender
5. Centrifugar nuevamente y eliminar sobrenadante, resuspender nuevamente en 2 ml de NaOH
6. Remojar 30 semillas en cada tubo durante 15 minutos.
7. Una vez se cumpla el tiempo, dejar secar las semillas en papel absorbente estéril.

#### **Anexo 6. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN NUTRITIVA HOAGLAND**

CONCENTRACION STOCK	COMPUESTO	1L 100%	1L 5% (mL)	500 mL 5% (mL)	100 mL 5% (mL)
1000x	micronutrientes	500 µl	25	12,5	2,5
1M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4 mL	200	100	20
1M	KNO <sub>3</sub>	6,5 mL	325	162,5	32,5
0,25M	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8 mL	400	200	80
0,25M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400 µl	20	10	4
0,25M	KCl	200 µl	10	5	2
0,146M Fe	Fe-EDTA	308 µl	15,4	7,7	3,1
	Agua-d	a 1L	a 1L	a 500 mL	a 100 mL

## Anexo 7 PROTOCOLO PARA SOLUCIONES NUTRITIVAS DE ENSAYO DE PAPA

Para cada materia adicionar 200 ml de cada solución, por lo tanto, se deben preparar 3,6 litros de cada una de estas.

Ensayo 1	ATCC	QA8	QA23	QA44	R11	CO-INOC
Suelo con poco nitrógeno	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat
	ATCC - N	QA8-N	QA23 - N	QA44 - N	R11-N	COINOC - N

Hoagland sin notrogeno		
CONCT STOCK	COMPUESTO	1L 100%
1000x	micronutrientes	500 microL
1M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4 mL
0,25M	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8 mL
0,25M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400 microL
0,25M	KCl	200 microL
0,146M Fe	Fe-EDTA	308 microL
	Agua-d	a 1L

Ensayo 2	ATCC	QA8	QA23	QA44	R11	CO-INOC
Suelo sin fósforo soluble pero con Ca <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (insoluble)	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat
	ATCC-	P QA8-P	QA23 - P	QA44 - P	R11-P	COINOC - P

Hoagland fosforo insoluble		
CONCT STOCK	COMPUESTO	1L 100%
1000x	micronutrientes	500 microL
1M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4 mL
1M	KNO <sub>3</sub>	6,5 mL
0,25M	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8 mL
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Como es insoluble en agua, se deben adicionar 5 gr De polvo por matera
0,25M	KCl	200 microL
0,146M Fe	Fe-EDTA	308 microL
	Agua-d	a 1L

Control	ATCC	QA8	QA23	QA44	R11	CO-INOC
Suelo Hoagland 100 %	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat	3 mat
	ATCC control	QA8 control	QA23 control	QA44 control	R11 control	COINOC control

Hoagland para el control		
CONCT STOCK	COMPUESTO	1L 100%
1000x	micronutrientes	500 microL
1M	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4 mL
1M	KNO <sub>3</sub>	6,5 mL
0,25M	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8 mL
0,25M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400 microL
0,25M	KCl	200 microL
0,146M Fe	Fe-EDTA	308 microL
	Agua-d	a 1L

## Anexo 8. PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE INÓCULOS MICROBIANOS

	ATCC
<b>Suelo con poco nitrógeno</b>	3 mat ATCC - N
<b>Suelo sin fósforo soluble, pero con Ca<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	3 mat ATCC - P
<b>Suelo con Hoagland 100%</b>	3 mat ATCC control

### ESCALA McFARLAND

Nº	BaCl <sub>2</sub> 0,048M ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,36M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5 · 10 <sup>8</sup>
1	0,1	9,9	10	3 · 10 <sup>8</sup>
2	0,2	9,8	10	6 · 10 <sup>8</sup>
3	0,3	9,7	10	9 · 10 <sup>8</sup>
4	0,4	9,6	10	12 · 10 <sup>8</sup>
5	0,5	9,5	10	15 · 10 <sup>8</sup>
6	0,6	9,4	10	18 · 10 <sup>8</sup>
7	0,7	9,3	10	21 · 10 <sup>8</sup>
8	0,8	9,2	10	24 · 10 <sup>8</sup>
9	0,9	9,1	10	27 · 10 <sup>8</sup>
10	1	9	10	30 · 10 <sup>8</sup>

Para los inóculos debemos infectar 9 materas por cada cepa y coinóculo. Entonces el procedimiento para preparar estas bacterias será:

1. Tener una placa fresca de cada cepa.

2. En Falcon de 15 mL inocular 6 ml de medio líquido con cada cepa (hacer 2 tubos de cada cepa) incubar a temperatura adecuada y en agitación horizontal a 200 rpm para que los medios se aireen de forma adecuada y permitan un mayor crecimiento.

3. En Erlenmeyer de 500 mL preparar en cada uno 100 mL de medio líquido estéril. Adicionar 5 mL del cultivo descrito en el punto 2. Para los coinóculos adicionar 3mL de cada cultivo crecido en un mismo Erlenmeyer. incubar a temperatura adecuada y en agitación de 200 rpm para que los medios se aireen de forma adecuada y permitan un mayor crecimiento.

4. Centrifugar y eliminar el caldo. Hacer 2 lavados con NaCl 0,9 – 0,85%. Con agua destilada llevar las células a una concentración de 0,5 escala McFarland, y repartir la solución final en 9, para adicionar a cada matera, según el tratamiento.

## Anexo 9. A Características macroscópicas y microscópicas de cepas bacterianas

CEPA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	GRAM
QA1	Colonia pequeña, color crema (Clara), Brillante, Borde liso, sin desplazamiento en Agar	Bacilos Gram negativos, medianos
QA 5	Colonia Grande color crema (claro), brillante, borde liso. Sin desplazamiento aparente	Bacilos Gram negativos cortos
QA 7	Colonia pequeña, color crema- amarilla, Translúcida, brillante, borde liso, sin desplazamiento	Bacilos Gram negativos pequeños
QA 8	Colonia Grande color crema (claro), brillante, borde liso. Sin desplazamiento aparente	Bacilos Gram negativos pequeños
QA 9	Colonia pequeña, color crema (Clara), Brillante, Borde liso, sin desplazamiento en el medio	Bacilos Gram negativos pequeños
QA10	Colonia pequeña, Color crema amarilla, ligeramente translúcida. Donde hay más densidad de bacterias se observa fenómeno de swarming.	Bacilos Gram negativos medianos
QA 13	Colonias similares a QA5 Y QA8	Bacilos Gram negativos medianos y gruesos
QA 14	Similar a QA7	Bacilos Gram negativos pequeños
QA 15	Crecimiento extendido no se observan colonias aisladas, las colonias observadas son color crema- amarillo, translúcido, bordes del crecimiento con pequeñas proyecciones	Bacilos Gram negativos, pequeños
QA 17	Colonias muy pequeñas, con tono amarillo-naranja, translúcidas, borde del crecimiento festoneada	Bacilos Gram negativos, pequeños
QA 23 A y B	Colonia pequeños amarillo claro translúcida, brillante. Donde hay mayor densidad la bacteria se extiende sobre la placa. A medida que disminuye la densidad, forma estructuras filamentosas de desplazamiento. A menor densidad no hay desplazamiento	Bacilos Gram negativos pequeños y estructuras Gram positivas
QA 24	Similar a QA23, SALVO: porque las colonias individuales son un poco más grandes y el borde no parece ser uniforme. También se observa que a mayor densidad de bacterias esta NO se extiende sobre la placa sino que se desplaza de forma filamentosas	Bacilos Gram negativos, medianos
QA 27	Colonias color crema claro, poco brillantes, rugosas a mayor densidad. las colonias tienen tamaño mediano, No son translúcidas, con borde Festoneado	Bacilos Gram positivos, largos, delgados
QA 28	Colonias muy pequeñas, color crema- amarillo claro, brillantes y translúcidas	Bacilos Gram negativos cortos
QA 29	Crecimiento sin colonias aisladas, colonias pequeñas, escasas, brillantes, no son translúcidas, con desplazamiento aparente, tono color Naranja	Bacilos Gram negativos, cortos
QA 31	Crecimiento similar a QA15	Bacilos Gram negativos, pequeños
QA 34	Crecimiento similar a QA 29 con tono naranja	Cocobacilos Gram negativos
QA 42	Crecimiento con fenómeno de swarming: la colonia crece formando ligeras proyecciones; los espacios se van llenando y las zonas centrales es más densa que los bordes del crecimiento. Es color claro brillante	Bacilos Gram negativos medianos
QA 43	Colonia color crema con desplazamiento en swarming	Bacilos Gram positivos, largos y delgados
QA 44	Colonias color crema claro con desplazamiento en fenómeno de swarming	Bacilos Gram negativos, cortos

### Anexo 9 B Crecimiento en Agar MacConkey y Agar King B

Cepa	Agar MacConkey	Agar King B
QA1	Crecimiento, fermentación	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 5	Crecimiento, sin fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 7	Crecimiento, fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 8	Crecimiento, sin fermentación de lactosa	No hubo crecimiento
QA 9	Crecimiento, sin fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 13	Crecimiento, fermentación de lactosa	
QA 14	Crecimiento, fermentación de lactosa	
QA 15	Crecimiento, fermentación de lactosa	Crecimiento (masivo, la bacteria se extendió)
QA 17	No hubo crecimiento	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 23 A y B	Lisa: Crecimiento, sin fermentación de lactosa, Pelitos: No hubo crecimiento	
QA 24	Crecimiento, fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia
QA 27	No hubo crecimiento	Crecimiento (masivo), sin fluorescencia
QA 28	Crecimiento, sin fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 29	No hubo crecimiento	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 31	Crecimiento, fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 34	No hubo crecimiento	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 42	Crecimiento, fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia sin
QA 43		Crecimiento, fluorescencia sin
QA 44	Crecimiento, sin fermentación de lactosa	Crecimiento, fluorescencia sin

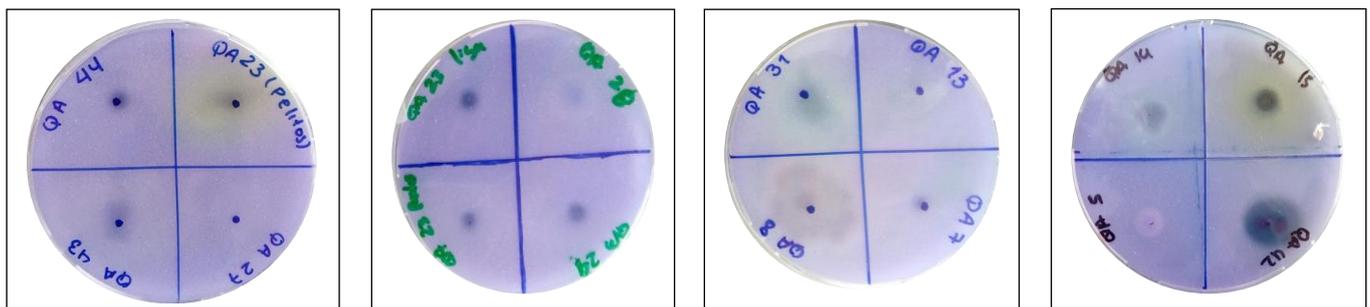
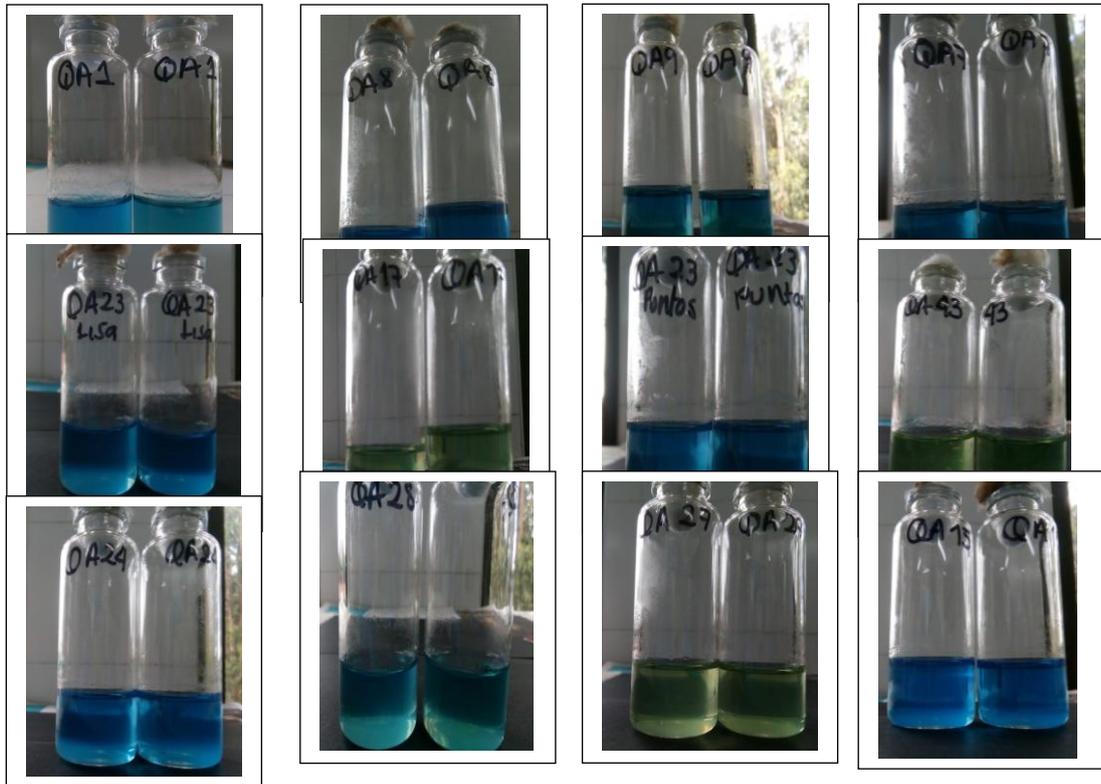
### Anexo 9 C Crecimiento en Agar cetrimide

Cepa	Agar Cetrimide
QA1	No hubo crecimiento
QA 5	No hubo crecimiento
QA 7	No hubo crecimiento
QA 8	Crecimiento, sin fluorescencia
QA 9	No hubo crecimiento
QA10	
QA 13	Crecimiento escaso
QA 14	Crecimiento, sin fluorescencia
QA 15	No hubo crecimiento
QA 17	No hubo crecimiento
QA 23 A y B	Lisa: Crecimiento muy escaso, Puntos: Crecimiento con fluorescencia

QA 24	Crecimiento, fluorescencia
QA 27	No hubo crecimiento
QA 28	No hubo crecimiento
QA 29	No hubo crecimiento
QA 31	Crecimiento, fluorescencia
QA 34	Crecimiento muy escaso, sin fluorescencia
QA 42	Crecimiento, sin fluorescencia
QA 43	No hubo crecimiento
QA 44	Crecimiento, con fluorescencia

### Anexo 10. REGISTRO FOTOGRAFICO DE LOS RESULTADOS INICIALES NE MEDIO NFb Y NBRIP

#### RESULTADOS NFb y NBRIP



**Anexo 11 TABLAS DIFERENCIAS ENTRE LOS PESOS FRESCOS Y SECOS EN GRAMOS DE MASA VEGETAL Y RAÍZ OBTENIDOS APARTIR DE LOS TRATAMIENTOS EN SUELO.**

<b>(A) POCO NITRÓGENO (T1)</b>		
BACTERIA	RAÍZ	AÉREA
QA 8	13,79gr	23,90gr
QA23	5,17gr	16,27gr
QA44	6,44gr	22,65gr
R11	6,17gr	24,29gr
Co-inóculo	5,56gr	26,81gr
ATCC	6,90gr	24,53gr

<b>(B) FOSFORO INSOLUBLE (T2)</b>		
BACTERIA	RAÍZ	AÉREA
QA 8	5,78gr	26,84gr
QA23	5,49gr	29,08gr
QA44	7,26gr	30,37gr
R11	5,14gr	23,21gr
Co-inóculo	7,42gr	18,53gr
ATCC	9,18gr	20,15gr

<b>(C) HOAGLAND 100%</b>		
BACTERIA	RAÍZ	AÉREA
QA 8	6,01gr	26,85gr
QA23	7,49gr	26,08gr
QA44	6,22gr	24,47gr
R11	5,74gr	26,89gr
Co-inóculo	7,41gr	27,90gr
ATCC	5,27gr	25,48gr

**ANEXO 12. NUTRIENTES DEL SUELO DEL ENSAYO Y DOSIFICACIONES RECOMENDADAS**

<b>ANÁLISIS DE FERTILIDAD DEL SUELO USADO PARA LOS ENSAYOS</b>		<b>PRODUCTO COMERCIAL</b>		<b>RECOMENDACIÓN ICA 1992</b>	
Nutriente	Cantidad kg/ha	Nutriente	Cantidad recomendada kg/ha	Nutriente	Cantidad recomendada kg/ha
Amonio	236,16	N	294	Páramos de Cundinamarca y Boyacá	
nitrate	83,52	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	334	N	100 a 150
N-mineral	319,68	K <sub>2</sub> O	316	P <sub>2</sub> O <sub>3</sub> < 40 ppm	375 a 450
Fósforo	109,8	CaO	52,35	Altiplano Cundi-boyacense	
Relación ppm a kg/ha según: <a href="https://www.smart-fertilizer.com/es/articulos/ppm-in-soil/">https://www.smart-fertilizer.com/es/articulos/ppm-in-soil/</a>		MgO	39,92	N	50 a 100
		S	56,92	P <sub>2</sub> O <sub>3</sub> < 40 ppm	300 a 375
		Zn	56,4	Fuente: Libro técnico Fertilización de cultivos en clima frío	
		B	680,6		
		Fuente: manual para cultivo de papa. Yara Colombia S.A.			

## Anexo 13. Análisis 1 de suelos de Quiba Alta

### REPORTE DE ANÁLISIS DE SUELO No. 180-2018

Página 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

FCA-L-FT-10.002.007

<b>Remitente:</b> Nancy Castillo	<b>Finca:</b> Quiba Alta	<b>Lote:</b> 1
<b>E-mail:</b> nancastillo@uan.edu.co	<b>Propietario:</b> No reporta	<b>Recibido:</b> 2018-02-20
<b>Dirección:</b> No reporta	<b>Municipio:</b> No reporta	<b>Reportado:</b>
<b>Teléfono:</b> No reporta	<b>Dpto:</b> No reporta	<b>Recibo No.:</b> 901-103-21118
<b>Ciudad:</b> Bogotá	<b>Cultivo:</b> No reporta	

### RESULTADOS

pH	CE dS/m	CO	N	Ca	K	Mg	Na	AI	CICE	CIC
		%		meq / 100g						
5,4	ns	8,87	0,76	7,09	0,93	1,93	0,14	1,17	11,3	ns

ns: no solicitado

P	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
mg / kg							%			
42,3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	13	24	62	FA

Los resultados corresponden únicamente a las muestras suministradas por el usuario y analizadas en el laboratorio



PARÁMETRO	MÉTODOS DE ANÁLISIS	VALORACIÓN
<b>pH</b>	Suspensión suelo:agua (relación peso:volumen 1:1)	Potenciométrica
<b>CE:</b> Conductividad eléctrica	Extracto de la pasta de saturación	Conductimétrica
<b>CO:</b> Carbono orgánico oxidable	Walkley-Black	Colorimétrica
<b>N:</b> Nitrógeno total	Estimado a partir del CO (factor empleado 0,0862)	Absorción Atómica
<b>Ca, K, Mg, Na:</b> Bases intercambiables	Extracción con NH <sub>4</sub> -Acetato 1M pH 7	Volumétrica
<b>CIC:</b> Capacidad de intercambio catiónico	Desplazamiento del NH <sub>4</sub> intercambiado con NaCl	Volumétrica
<b>CICE:</b> CIC Efectiva	Estimado por suma de bases y acidez intercambiables	Volumétrica
<b>AI:</b> Acidez intercambiable	Extracción con KCl 1M	Colorimétrica
<b>P:</b> Fósforo disponible	Bray II	Colorimétrica
<b>S:</b> Azufre disponible	Extracción con fosfato monocalcico	Turbidimétrica
<b>Cu, Fe, Mn, Zn:</b> Microelementos	Extracción con DTPA	Absorción Atómica
<b>B:</b> Boro	Extracción con fosfato monocalcico	Colorimétrica
<b>Ar:</b> Arcilla, <b>L:</b> limo, <b>A:</b> arena	Bouyoucos, dispersión con Na-Hexametafosfato	Densimétrica
<b>Textura</b>	Triángulo de clasificación textural USDA	

### NIVELES GENERALES DE REFERENCIA

Elemento	Clima	Alto	Medio	Bajo	Elemento	Alto	Medio	Bajo
	Frío	>0.50	0.25-0.50	<0.25	P	>40	20-40	<20
N	Medio	>0.25	0.15-0.25	<0.15	K	>0.35	0.15-0.35	<0.15
	Cálido	>0.20	0.10-0.20	<0.10	Ca	>6	3,0-6,0	<3
					Mg	>2.5	1.5-2.5	<1.5

Coordinadora: *Martha Cecilia*

RECUERDE: El plan de fertilización es más eficiente si Ud consulta con el profesional de Asistencia Técnica de su localidad

Laboratorio de Aguas y Suelos. Facultad de Agronomía. Edificio 500 Cuarto Piso  
 Conmutador 316 5000 Extensiones 19088 ó 19049; Telefax 316 5498  
 Correo electrónico: [labsuelo\\_faqbog@una.edu.co](mailto:labsuelo_faqbog@una.edu.co)  
 Bogotá, Colombia

## Anexo 14. Análisis de suelo utilizado para los ensayos en invernadero



### FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEOLOZANO CENTRO DE BIO-SISTEMAS

Autopista Norte Km10 Via Bogotá - Briceño Chia (Cundinamarca)  
Teléfono 2427030 Ext 2430/2431

#### LABORATORIO DE SUELOS Y AGUAS ANÁLISIS FERTILIDAD EN SUELOS

<b>Muestra</b> No. Muestra: 000062 Identificación: SUELO ESTERIL  Orden de Trabajo No.: 000081 Fecha de Solicitud: 03-feb-20 Fecha de Impresión: 17-feb-20 Cultivo: Iomate		<b>Cliente</b> Nombre: MARIA FERNANDA MORENO LONDOÑO Dirección: CR 75 150-50 Municipio: BOGOTA Teléfono: 3112079961 Fax: E-Mail: mfernandamoreno@unicolmayor.edu.co		<b>Finca</b> Nombre: SUELO ESTERIL  Municipio: Departamento:	
Solicitante: MARIA FERNANDA MORENO LONDOÑO					

ELEMENTO ANALIZADO	pH	C.E. dS/m	Elementos Mayores (mg * kg <sup>-1</sup> ó ppm)										Elementos Menores (mg * kg <sup>-1</sup> ó ppm)					
			N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Amonio	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Nitrito	N-Min. Nitrato	P Fósforo	K Potasio	Ca Calcio	Mg Magnesio	Na Sodio	Al Acidez	S Azufre	Cl <sup>-</sup> Cloruro	Fe Hierro	Mn Manganeso	Cu Cobre	Zn Zinc	B Boro
RESULTADO DEL ANÁLISIS	5.8	1.85	65.6	23.2	88.8	30.5	607	3547	300	119		238.8	N.A	64.7	34.7	0.7	4.7	0.25
Resultado en cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup>							1.55	17.70	2.47	0.52	0.00							
INTERPRETACIÓN	Bajo	Exceso			Exceso	Optimo	Alto	Optimo	Bajo			Exceso	Optimo	Exceso	Exceso	Deficiente	Optimo	Bajo
BAJO	6	0.56			20	20	265	3440	423			45		15.0	11.3	1.1	3.4	0.34
ÓPTIMO	6.25	0.74			25	30	371	4763	582			60		20.0	15.0	1.5	4.5	0.45
ALTO	6.5	0.92			30	40	476	6086	741			75	106.5	25.0	18.8	1.9	5.6	0.56

#### Metodología:

pH en agua (1:1), Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) y bases de intercambio en acetato de amonio (1:20), elementos menores en DTPA (1:2), boro y C.E extracto de saturación. Acidez Intercambiable sólo cuando pH < 5.5; S por titrimétrica; N-mineral en Kjeldahl.

Otros Análisis y Parámetros de la Muestra			
Porcentaje de Agua Pw %	Porcentaje de Saturación Ps %	CIC (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	CICe (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )
0.8	116.9	52.9	22.2

#### Relaciones Catiónicas

Interpretación	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	(Ca+Mg)/K
		7.17	11.41	1.59
Valores Óptimos	3 - 5	12 - 18	4 - 6	12 - 20

Metodo Fósforo (P): Bray II

Quim. Adriana Mireya Zamudio S.  
Jefe Laboratorio de Suelos y Aguas

www.utadeo.edu.co  
NIT. 860.006.848-6  
Personería Jurídica  
No. 2613/1959 Minjusticia

Sede Chia  
Autop. Norte Km. 10 vía Bogotá-Briceño  
PBX 8650218/219/239  
centro.biosistemas@utadeo.edu.co  
Chía - Colombia

**Anexo 14. Corrido electroforético de cepas QA44 Y R11**

**A**

**B**

