



Evaluación de la actividad de tres microorganismos psicrófilos frente al crecimiento y desarrollo vegetal de plántulas de Albahaca (*Ocimum basilicum*) y Menta (*Mentha piperita*) susceptibles a bajas temperaturas

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, junio de 2022**



Evaluación de la actividad de tres microorganismos psicrófilos frente al crecimiento y desarrollo vegetal de plántulas de Albahaca (*Ocimum basilicum*) y Menta (*Mentha piperita*) susceptibles a bajas temperaturas

Estudiante

Nicolas Andrés Buitrago Tovar

Asesora Interna

Ligia Consuelo Sánchez Leal Mg.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, junio de 2022

DEDICATORIA

A:

A mis padres, porque son las personas más importantes en mi vida, porque siempre me apoyan en todas mis decisiones, confían en mis capacidades y por darme la tranquilidad de saber que está bien equivocarme. De no ser por ellos, no sería un buen ser humano.

A mi hermana, que siempre es un apoyo incondicional y me motiva a ser un ejemplo a seguir.

A mis familiares que siempre confían en mí y se muestran orgullosos de mis logros.

A mis mejores amigos, por entender el tiempo que le dedicaba a mi estudio y estar ahí para darme tranquilidad siempre que los necesito.

A mis amigos, compañeros de estudio y personas que llegaron al final que fueron un apoyo gigante en mis momentos de crisis durante mi formación.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora Ligia Consuelo Sánchez por su paciencia, por brindarme sus conocimientos, por confiar en mis capacidades y por dedicar su tiempo a guiarme para hacer este trabajo.

A todos los profesionales que me ayudaron dándome apoyo y consejos para mejorar mi trabajo.

Al semillero NEONATURE y a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por permitirme los espacios y materiales para el desarrollo de mi trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
1. ANTECEDENTES	14
2. MARCO REFERENCIAL	19
2.1 GENERALIDADES DE LOS PSICRÓFILOS	19
2.2 UTILIDAD DE LOS PSICRÓFILOS	20
2.3 UTILIDAD EN EL CRECIMIENTO VEGETAL	12
2.4 POSIBLES ESPECIES BACTERIANAS A UTILIZAR	23
2.5 AROMÁTICAS EN COLOMBIA	25
2.6 AROMÁTICAS A EVALUAR	27
2.7 PRINCIPALES CAUSAS DE PÉRDIDAS DE CULTIVOS DE AROMÁTICAS	28
3 DISEÑO METODOLÓGICO	30
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN, UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA	30
3.2 HIPÓTESIS, VARIABLES E INDICADORES	30
3.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	31
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Variables e indicadores	30
Tabla 2 Modelo para el bioensayo con plantas aromáticas	34
Tabla 3 Variables medidas	35
Tabla 4 Características de los microorganismos aislados	35
Tabla 5 Características de los microorganismos aislados en medios específicos	39
Tabla 6 Comparación de los controles protegidos y las repeticiones de albahaca y menta	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Procedimiento en laboratorio para valorar la capacidad bioquímica	32
Figura 2 Procedimiento bioensayo en plantas aromáticas	34
Figura 3 Crecimiento de las cepas a estudiar	37
Figura 4 Crecimiento de microorganismos psicrófilos en medios específicos	38
Figura 5: Clasificación de los microorganismos psicrófilos según el crecimiento en medios específicos.	38
Figura 6 Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 04/12/21	41
Figura 7 Datos de crecimiento de plántulas de albahaca, revisión 04/12/21	42
Figura 8 Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 18/12/21	42
Figura 9 Datos de crecimiento de plántulas de albahaca, revisión 18/12/21	43
Figura 10 Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 01/01/22	44
Figura 11 Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 01/01/22	44
Figura 12 Floración de planta de albahaca.	38
Figura 13 Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 15/01/22	46
Figura 14 Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 15/01/22	46
Figura 15 Comparación datos de crecimiento de los controles de menta	47
Figura 16 Comparación datos de crecimiento de los controles de albahaca	48
Figura 17 Datos de longitud de la raíz en cms menta	49
Figura 18 Datos de longitud de la raíz en cms albahaca	49
Figura 19 Registro de temperaturas diciembre 2021 - enero 2022	51



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Evaluación de la actividad de tres microorganismos psicrófilos frente al crecimiento y desarrollo vegetal de plántulas de Albahaca (*Ocimum basilicum*) y Menta (*Mentha piperita*) susceptibles a bajas temperaturas

RESUMEN

Los glaciares de la Antártida son un ecosistema diverso con muchos tipos de microorganismos que, por estar en un ambiente extremo, pueden tener potencial biotecnológico y ser utilizados como soluciones desde la bioprospección. El objetivo de este trabajo fue evaluar el posible potencial que tienen algunas bacterias aisladas del ecosistema Antártico, frente al crecimiento y desarrollo vegetal en dos plantas aromáticas: Menta y Albahaca. La metodología consistió en verificar la viabilidad y pureza de las especies bacterianas congeladas en el Cerapio de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, procedentes de la Antártida, establecer su funcionalidad en el desarrollo y crecimiento de las plantas utilizando medios de cultivo específicos in vitro, seleccionar las que presentaron los mejores resultados en estas pruebas y realizar bioensayos en condiciones de cielo abierto con plántulas aromáticas susceptibles al frío, utilizando pruebas con control, midiendo el crecimiento de tallo y raíz, número de hojas y cambios de color o aspecto en filósfera. Los principales resultados evidenciaron que la Menta no se vió beneficiada en su desarrollo con ninguna de las bacterias seleccionadas, pero, la albahaca, sí demostró desarrollo en su crecimiento e incluso, llegó a la fase

reproductiva con florescencia para las tres bacterias utilizadas. Se concluyó que los microorganismos psicrófilos seleccionados AL 10, AL11 y AL 16 identificadas anteriormente como los géneros de Brevundimonas, Artrhobacter y Pseudomonas, pueden ser útiles para la protección y desarrollo de Albahaca (*Ocimum basilicum*) en condiciones de cielo abierto. Se recomienda controlar algunas variables para futuros experimentos y verificar con otros ensayos funcionales in vivo y no solamente in vitro. Palabras clave: Microorganismos psicrófilos, promotores de crecimiento vegetal, plantas aromáticas, actividad bioquímica.

Estudiante: Nicolas Andres Buitrago Tovar.

Docente: Ligia Consuelo Sánchez Leal.

Fecha: Junio 2022

INTRODUCCIÓN

En Colombia, las plantas aromáticas, medicinales, de condimento y afines, son cultivos con buena productividad e interés comercial. Se caracterizan por contener cantidades de compuestos químicos fácilmente perceptibles por el olfato. Estas propiedades las hacen parte de una cadena de producción que garantiza la comercialización del producto y, así mismo, se asegura del desarrollo social y económico de los agricultores (1). En Colombia, se presenta una gran variedad de especies de plantas aromáticas a lo largo del territorio, siendo el principal productor el departamento de Cundinamarca (2). De acuerdo con encuestas realizadas por el Instituto Alexander Von Humboldt en el país, las especies con mayor volumen comercial son la caléndula (*Calendula officinalis*), la alcachofa (*Cynara scolymus*) y la valeriana (*Valeriana officinalis*) (3).

Según estudios en la región de Sumapaz (Cundinamarca), los cultivos de plantas aromáticas se vieron afectados por distintos factores que ocasionaron pérdidas incluso del 50% (4). Dentro de los factores asociados a las pérdidas, está la sensibilidad de algunas aromáticas como Albahaca (*Ocimum basilicum* L) y Menta (*Mentha piperita* L) a los descensos de las temperaturas, las cuales se pueden presentar en las noches y afectar la producción (5–7). Por lo tanto, el factor clima, (especialmente el frío) y las heladas, representan pérdida en la producción de cultivos de plantas aromáticas que son sensibles a estos cambios de temperatura.

Para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas bajo cualquier condición, se requiere la disponibilidad de varios nutrientes esenciales que, generalmente, se encuentran en el suelo, pero que no pueden ser absorbidos por el organismo vegetal, ya que dichas moléculas se encuentran disponibles de maneras muy complejas para ser asimiladas (8). Esta disposición que requieren las plantas depende de la actividad biológica de los microorganismos que se encuentran en la rizosfera, sitio donde se activan actividades bioquímicas cuando la planta emerge y pasa por las diferentes etapas fenológicas.

Se ha observado que, aunque las rizobacterias en terrenos montañosos hacen su aporte en nutrientes a la planta, la actividad metabólica de estos microorganismos se detiene o cambia por las bajas temperaturas a las que se ven expuestas. Además de los problemas nutricionales, las plantas que crecen en climas fríos deben enfrentarse a condiciones adversas del ambiente, como la humedad, el pH y la salinidad del suelo; todos estos factores, afectan directamente el crecimiento y producción agrícola, ocasionando así un descenso en la producción y, en consecuencia, en los ingresos económicos de las comunidades que subsisten de estas formas de producción (9,10).

La Antártida ha sido una fuente de estudio muy diversa para distintos campos profesionales, como es el caso de la microbiología, en donde se ha demostrado en diversos estudios, que microorganismos que se desarrollan naturalmente en estas condiciones presentan características útiles que benefician el desarrollo en plantas en climas fríos, ya que logran darles protección, nutrición y promueven su crecimiento. El objetivo del presente trabajo es analizar las diferentes capacidades bioquímicas de las bacterias aisladas y viables de la Antártida mediante pruebas in vitro utilizando medios de cultivo que demuestran reacciones específicas útiles en el desarrollo de las plantas, e In vivo, a través de bioensayos a cielo abierto para observar la relación que establecen con plántulas de albahaca y menta en cuanto a crecimiento y desarrollo, mediante la medición de la longitud del tallo y raíz, número de hojas y cambios de color o aspecto. Los bioensayos incluyeron un control de las plantas en un ambiente protegido de los cambios de temperatura para verificar la sanidad de las plantas y su desarrollo sin condiciones adversas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de tres microorganismos psicrófilos frente al desarrollo vegetal de las plantas aromáticas de Albahaca y Menta susceptibles a disminuir su producción por las bajas temperaturas, utilizando bioensayos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.Verificar la pureza y viabilidad de las cepas bacterianas procedentes de la Antártida conservadas en el cerapio de la UCMC.
- 2.Establecer in vitro la funcionalidad bioquímica de los microorganismos y su utilidad en el desarrollo y crecimiento de las plantas.
- 3.Desarrollar un bioensayo en plantas aromáticas de Albahaca y Menta susceptibles al frío para comprobar si los microorganismos psicrófilos seleccionados eran capaces de mejorar las condiciones de desarrollo y crecimiento de las plantas en estudio.

1. ANTECEDENTES

A continuación, se presentan las principales investigaciones previas sobre los microorganismos y su utilidad en el desarrollo de plantas y semillas. En los primeros años se describen investigaciones en donde se comprueba la actividad sobre el crecimiento y desarrollo de plantas utilizando bacterias.

Cavalca y colaboradores en 2009, analizaron una comunidad rizobacteriana asociada con las raíces del cardo silvestre en contacto con un suelo contaminado con arsénico. Dentro de los aislamientos realizados, se encontraron 13 microorganismos, de los cuales el más importante fue *Ancylobacter dicloromethanicum* ya que fue capaz de reducir el arsenato y el óxido de sodio en el suelo circundante a los cardos, por lo que se supone que posee un gran potencial en el crecimiento de plantas en suelos contaminados.

Dhara Sachdev y colaboradores en 2009 evaluaron la diversidad de especies de *Acinetobacter* en la rizosfera de diferentes campos agrícolas, el estudio y la caracterización in vitro de los aislados de los cultivos mostraron rasgos como la fijación, producción de sideróforos y solubilización de minerales.

Márquez y colaboradores en 2010, investigaron la diversidad microbiana en raíces de tomate de cáscara mexicana y evaluaron cómo su actividad influye en el crecimiento de la planta, por medio de ensayos moleculares (amplificación y secuenciación de los genes de ADN16s) se encontró una diversidad de géneros bacterianos, dentro de estos: *Stenotrophomonas* (21,9%), *Microbacterium* (17,1%), *Burkholderia* (14,3%), *Bacillus* (14,3%) y *Pseudomonas* (10,5%).

Lei Zhao en 2012 aisló una cepa bacteriana con la capacidad de degradar compuestos y pesticidas clorpirifos y además con la capacidad de generar diversos compuestos útiles para la promoción de crecimiento vegetal como lo son la producción de ácido indol-3-acético, producción de ácidos y sideróforos.

Montañes et al, en 2012, probaron 22 bacterias endofíticas aisladas de plantas de maíz para evaluar su efecto en el crecimiento vegetal, las cuales se identificaron y caracterizaron mediante la presencia de nifH, producción de IAA, sideróforos y fosfatos. Por medio de los resultados se detectó la capacidad de *P. fluorescens* (EMA68) y *Rhanella spp.* (EMA83) para promover el crecimiento en brotes de maíz, ya que aumentó significativamente el crecimiento de la radícula en comparación con el de los controles sin inoculación.

En esta investigación realizada por Nath et al en 2014 se observa por primera vez la actividad que tienen comunidades extremófilas (incluido el ser psicrófilas) en el desarrollo y crecimiento de las plantas, evaluando las diferentes comunidades microbianas de los desiertos fríos del Himalaya noroccidental por medio de técnicas moleculares. Los resultados demostraron un total de 232 cepas bacterianas. Posteriormente, fueron seleccionadas por sus atributos de promoción del crecimiento de las plantas, que incluyeron la producción de amoníaco, HCN, ácido giberélico, IAA y sideróforos; solubilización de fósforo y actividad de ACC desaminasa. Además, el ensayo evalúa la actividad antifúngica de los mismos frente a *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*.

Avilés y colaboradores en 2015, desarrollaron una investigación en la cual se tuvo como objetivo evaluar la capacidad de la bacteria rizosférica *Arthrobacter agilis* para promover el crecimiento de plantas leguminosas. Los resultados de los ensayos mostraron que la bacteria es capaz de producir compuestos volátiles que estimulan los mecanismos de absorción de hierro en plantas y que, además, las protege de agentes fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*.

En ese mismo año, Balcazar et al, describen la diversidad de microorganismos obtenidos de glaciares, los cuales se caracterizan por ser metabólicamente versátiles, altamente tolerantes a múltiples tensiones ambientales y potencialmente útiles para fines biotecnológicos cómo ser usados como promotores del crecimiento vegetal con carácter fertilizante. Mediante análisis de hielo de glaciar se identificaron microorganismos con capacidades adicionales de PGP, incluida la producción de fitohormonas y HCN, la excreción de sideróforos y la inhibición de fitopatógenos.

Igualmente, Yarzabal et al en 2015, desarrolló un estudio el cual tuvo como objetivo aislar los promotores del crecimiento de plantas activos en frío como *Pseudomonas* spp de suelos antárticos y probar sus efectos PGP, tanto in vitro como en cultivos de trigo. Los resultados demostraron que *Pseudomonas* spp es metabólicamente activo y, además, inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* y *Phytophthora infestans*.

Montejo y colaboradores en 2016, realizaron un trabajo en el cual evaluaron el efecto de *A.agilis UMCV2* sobre la germinación y el crecimiento de plantas de interés económico y forestal como *Pinus devoniana*. Los resultados de la evaluación demostraron que es capaz de incrementar el índice de germinación de la planta tanto en la parte aérea como en las raíces laterales.

En el artículo de revisión de Pandey et al en 2018, se describen los entornos montañosos y el cómo los microorganismos que viven en estos se adaptaron a las bajas temperaturas. Además, se recalca el papel que juegan en los suelos como promotores del crecimiento y desarrollo de las plantas denominándose PGPM, con el fin de reconocer la importancia de este recurso microbiano para mejorar la calidad de los cultivos en terrenos montañosos con bajas temperaturas.

Man You y su equipo en 2019 aislaron una cepa bacteriana de *Burkholderia cenocepacia* de las raíces de la planta de maíz (*Zea mays*) en Canadá, se confirma por filogenia e hibridación de ADN y se describen sus características promotoras de crecimiento como lo fueron la solubilización del fosfato en condiciones de invernadero.

Hernández y colaboradores en 2019, probaron el efecto de las bacterias estimulantes *Arthrobacter agilis* UMCV2 y *Bacillus methylotrophus* M4-96 en plantas de fresa mediante la germinación in vitro en un invernadero; al evaluar los resultados luego de 10 meses, se observó que las plantas inoculadas con los agentes bacterianos tuvieron un rendimiento de frutos 42% más alto que los controles no inoculados.

En este mismo año, Tapia y colaboradores desarrollaron un estudio en el cual realizan el aislamiento de microorganismos psicrófilos recolectados del volcán Xinantécatl en México para promover el crecimiento en plantas. Los resultados demostraron que la mayoría de las levaduras aisladas producían ácido indol acético y enzimas hidrolíticas (celulasas, xilanasas y quitinasas). Sin embargo, no se evidenció la producción de sideróforos en ninguno de ellas, mientras que las bacterias aisladas demostraron actividad bioquímica que es de vital importancia para el desarrollo vegetal.

Por su parte, Rondón et al en 2019, realizó un estudio en el cual, de una colección de bacterias aisladas de glaciares venezolanos, se seleccionaron cuatro especies de *Pseudomonas* y se probaron sus efectos PGPR a bajas temperaturas in vitro y en plántulas de trigo. Los resultados demostraron que todas las especies de *Pseudomonas* utilizadas crecieron bien en una amplia gama de temperaturas y mostraron actividad como PGPR mediante la solubilización de fosfatos inorgánicos, producción de fitohormonas y antagonismo contra un oomiceto fitopatógeno *Pythium ultimum*.

En este mismo año, Singh et al, investigaron la posibilidad de la estabilización del arsénico en el ambiente mediante la aplicación de nuevos aislamientos de la cepa *Brevundimonas diminuta* (NBRI012) en plantas de arroz. Los resultados demostraron rasgos bacterianos como la inherencia de sideróforos, fosfato solubilización, producción de ácido indolacético (IAA), 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) y desaminasas que pueden estar asociadas al crecimiento en plantas de arroz. El estudio también reveló que la cepa (NBRI012) restauró significativamente la raíz de la planta frente a la contaminación por arsénico.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Generalidades de los psicrófilos

Aunque la presencia de microorganismos en la nieve y el hielo glacial se informó hace más de un siglo (11), sólo hasta principios de la década de 1908 los microbiólogos decidieron dirigir su atención a los microbios del hielo. Dentro de los estudios hechos por Schmidt-Nielsen en 1992, describieron por primera vez una bacteria capaz de crecer y sobrevivir a 0°C (12). Posteriormente, para definir un término que abarcara a este tipo de microorganismos, se publicó una revisión en el año 1975 por Richard y Morita, en la que proponía la definición de psicrófilo como "... aquel organismo con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 15°C o menor, una máxima temperatura de crecimiento alrededor de los 20°C y una mínima temperatura de crecimiento a 0°C o por debajo". Los psicrófilos obligados son microorganismos que crecen en los hielos de zonas polares (Ej. algas), mientras que los psicrófilos facultativos tienen una distribución más amplia (hay varios géneros de hongos, algas, protozoos que tienen miembros de este tipo) (13).

Los microorganismos psicrófilos son capaces de sobrevivir en ambientes fríos debido al resultado de la evolución molecular que, junto a varias adaptaciones, son capaces de contrarrestar los efectos potencialmente nocivos de los ambientes extremos que les rodean. El éxito de este grupo de organismos para sobrevivir en cualquier ecosistema depende de qué tanto pueden satisfacer sus necesidades nutritivas y, para todos los casos, uno de los parámetros de mayor importancia es la temperatura. Al encontrarse en ambientes que rozan la congelación, los microorganismos se enfrentan a la poca disponibilidad de agua en estado líquido, lo que repercute en las actividades metabólicas limitando así su crecimiento (14).

Para poder sobrevivir, es necesario realizar adaptaciones biológicas que permitan satisfacer necesidades particulares. Una de estas estrategias se basa en la modificación de la membrana de los psicrófilos mediante la presencia de fosfolípidos insaturados o de cadena corta, el aumento de grupos metilo y una pequeña porción de ácidos grasos cíclicos. Todo esto, con el fin de brindarle un estado semifluido a la membrana del microorganismo para que se mantenga flexible y no colapse por la disminución de la temperatura (15). Otro método que aplican los microorganismos es acumular solutos

compatibles como glicina, betaína, glicerol, manitol y sorbitol. Estos compuestos altamente solubles permiten que se reduzca el punto de congelación de la fase acuosa citoplasmática, además de estabilizar macromoléculas como las enzimas, lo que permite la inhibición del crecimiento de cristales de hielo y la recristalización (16).

Cuando se detecta una disminución en la temperatura del medio, se induce la expresión de una serie de genes que son de ayuda para el desarrollo de microorganismos. Un ejemplo claro de este fenómeno es la expresión de proteínas de choque frío y helicasas que se encargan de la replicación del ADN y la síntesis de proteínas; éstas últimas resultan más resistentes al frío, debido a que disminuyen las interacciones iónicas y los puentes de hidrógeno y, además, presentan mayor cantidad de aminoácidos polares y de plegamientos alfa. Se sugiere que estas modificaciones suelen ser suficientes para generar un aumento o una disminución en la termoestabilidad de las enzimas permitiendo que estas macromoléculas se mantengan flexibles y no se detenga el metabolismo a bajas temperaturas (16–18).

2.2 Utilidad de los psicrófilos

Al ser microorganismos adaptados a ambientes extremos, sus productos enzimáticos son bastante atractivos para varias aplicaciones en la industria; las enzimas deben tener la especificidad requerida, una alta estabilidad en el entorno del proceso y si bien no todas las enzimas cuentan con estos requisitos, algunas son usadas con frecuencia en la industria (19).

Las enzimas psicrófilas son muy útiles en detergentes y productos de limpieza: estos productos utilizan principalmente enzimas hidrolíticas, las cuales tienen como fin descomponer manchas y suciedad depositándose en productos más solubles, lo que permite una mayor limpieza y rendimiento en lavanderías, lavavajillas y equipos de filtros de limpieza. El principal beneficio de usar enzimas adaptadas al frío en detergentes es que la temperatura del proceso y, por tanto, la entrada de energía se reduce, por ende, permite un impacto económico y medioambiental mejorado. Se estima que una reducción

en la temperatura de lavado de 40 a 30°C permite un ahorro del 30% en energía, correspondiente a 100-300 g de CO₂ por lavado (20).

También pueden ser utilizadas en la industria alimentaria como aditivos y coadyuvantes tecnológicos en la elaboración de quesos, vinos, cerveza y alimentos funcionales. Las enzimas psicrófilas son muy utilizadas para la preparación de alimentos y bebidas debido a su actividad catalítica a temperaturas que reducen el deterioro y la pérdida del valor nutricional del consumible. Incluso en la industria láctea son utilizadas β -galactosidasas para la producción de leche sin lactosa (21).

Las fosfatasas adaptadas al frío son comercializadas como herramientas para estudios de biología molecular. Generalmente es usada para la desfosforilación del extremo 5' del ADN o ARN durante los procedimientos de clonación y marcaje de extremos. Además, las nucleasas son usadas para degradar cadenas de ácidos nucleicos simples o dobles que puedan considerarse contaminantes en preparaciones de ARN, mezclas de PCR o en soluciones proteicas (22).

Muchos productos farmacéuticos, productos químicos finos, y fragancias, son sensibles al calor, por lo tanto, deben sintetizarse a bajas temperaturas a las que las enzimas adaptadas al frío son más activas. Actualmente, se comercializan proteasas adaptadas al frío como agentes terapéuticos contra infecciones bacterianas (degradación de biopelículas) y virales (reducción de la infectividad del virus) (23).

Para terminar, son foco de interés para el campo de los sistemas planetarios la astrobiología. La búsqueda de vida en otros sistemas planetarios tiene que apoyarse en estudios ambientales extremos, ya que algunos de estos microorganismos viven en ambientes de nuestro planeta que son análogos a los que pueden existir en otro planeta. (24)

2.3 Utilidad en crecimiento vegetal.

Teniendo en cuenta que gran parte de la superficie de la tierra presenta climas fríos, se presentan muchos problemas en cultivos de producción relacionados con la baja de temperatura, sin embargo, esta diversidad climática también permite encontrar diferentes ecosistemas (como los glaciares) los cuales contienen una amplia gama de

microorganismos biológicamente activos disponibles para su estudio (20,25). Los glaciares andinos y del Himalaya promueven el conocimiento de microorganismos extremófilos los cuales son muy útiles, ya que son capaces de resistir condiciones muy adversas de temperatura, pH, presión, salinidad, radiación entre otras (26,27). Todas estas características abren una puerta a la investigación biotecnológica para el desarrollo de procesos, productos y herramientas que permitan mejorar problemáticas del mundo actual. Dentro de estas aplicaciones se encuentra principalmente el uso de los mecanismos enzimáticos psicrófilos útiles en la fabricación de detergentes, productos farmacéuticos, cosméticos, textiles, biocombustibles y lo que más interesa en este trabajo: el uso de estos microorganismos como promotores del crecimiento vegetal (28,29).

Estudios recientes han evaluado la actividad de psicrófilos (levaduras y bacterias) aislados de glaciares en el crecimiento de diferentes tipos de plantas, midiendo la producción de sustratos metabólicos liberados en el suelo circundante a las raíces que generalmente son esenciales para el desarrollo de las estructuras vegetales. A estos microorganismos se les conoce como PGPM (Plant growth-promoting microorganisms). Además de estimular el crecimiento a bajas temperaturas, se ha demostrado también que pueden actuar como agentes de biocontrol. Todos estos avances biotecnológicos son beneficiosos para aumentar la productividad agrícola en terrenos montañosos como son los Andes o el Himalaya (22,30,31).

Debido a que los nutrientes de zonas montañosas son escasos, los microorganismos de la rizosfera son de gran importancia para las plantas ya que pueden influir en su crecimiento por diversos mecanismos, los más conocidos son la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas y la solubilización de fosfatos dispersos en el suelo (28).

La solubilización del fósforo inorgánico es primordial ya que es uno de los macronutrientes más usados por las plantas; si bien su actividad en el suelo es alta, no está disponible en formas accesibles, pues solo se encuentra como fosfato de hierro o de aluminio. Es aquí donde el microbiota del suelo tiene la capacidad de metabolizar estas moléculas y dejarlas en formas más sencillas para ser utilizadas por el organismo vegetal (32).

Se ha demostrado que las comunidades microbianas de ambientes glaciares transforman un entorno en condiciones de estrés en uno adecuado para el crecimiento de las plantas (33). Además, los microorganismos son capaces de producir enzimas líticas y sustancias biocidas que pueden ayudar a defender la planta de fitopatógenos comunes (26). Todas estas funciones son tan importantes que se cree que las plantas reclutan microorganismos circundantes del suelo para adaptarse al medio (34).

2.4 Posibles especies bacterianas psicrófilas a utilizar y su utilidad

Arthrobacter

Es un género bacteriano comúnmente encontrado en el suelo; todas las especies dentro de este género tienen morfología bacilar, además, son anaerobias facultativas Gram positivas. El género *Arthrobacter* es de gran utilidad ya que promueve el crecimiento vegetal por diversos mecanismos, entre otros, colaboran con el suministro de hierro soluble a la planta y la absorción del mismo, la producción de dimetilhexadecilamina, compuesto que tiene como principal función estimular el crecimiento radicular (35) y la producción de ácido indol 3 acético, una auxina que es de gran importancia en la modulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas, así como en la comunicación microorganismo-planta (36).

El género *Arthrobacter* ha mostrado ser útil en la promoción de crecimiento de diferentes tipos de plantas como *Medicago sativa* (alfalfa), *Capsicum annuum* (pimiento), *Zea mays* (maíz), *Medicago truncatula* (carretón), *Pinus devoniana* (Pino blanco de México) y *Fragaria* (fresa). En todos los casos anteriores, la presencia de *Arthrobacter* permitió la germinación y el crecimiento de las plantas de manera significativa e incluso mostró actividad inhibitoria contra fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi* (37–39).

Brevundimonas

Son un género de proteobacteria, Gram negativos, no fermentadores en forma de bacilo. Si bien, no muchos estudios dan a conocer su utilidad como promotora de crecimiento

vegetal, algunos pocos la evaluaron mediante el crecimiento y desarrollo en cultivos de *Gossypium* (algodón), *Solanum tuberosum* (papa), *Triticum* (trigo) y *Oryza sativa* (arroz). En estos estudios, los microorganismos del género *Brevundimonas* presentaron actividad que ayudó en el crecimiento vegetal. Se ha evidenciado la producción de ácido indol 3 acético, amoniaco, la fijación del nitrógeno y el uso de carbohidratos como la d-glucosa, galactosa, maltosa y celobiosa. Los resultados de dichas investigaciones informaron un aumento significativo de la altura de la planta, así como de las raíces. Además, el suelo presenta un gran contenido de nitrógeno y se evidenció que el microorganismo habitaba en la superficie de las plantas de maíz (40–42).

Pseudomonas

Pseudomonas es un género bacteriano con morfología bacilar Gram negativa, es ampliamente conocido ya que tiene diversas aplicaciones en microbiología ambiental. También es conocida por ser metabólicamente diversa y tolerante a distintos tipos de estrés biótico y abiótico.

Como promotora de crecimiento vegetal, *Pseudomonas* ha sido estudiada por su capacidad para solubilizar fosfatos en diferentes condiciones de temperatura y gran variedad de azúcares como fuente de carbono. Son capaces de comportarse como agentes de biocontrol inhibidores de patógenos vegetales, ya que excretan enzimas hidrolíticas capaces de degradar las paredes celulares y demás moléculas con efectos antimicrobianos como varios lipopéptidos cíclicos (LDP), antibióticos como 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pioluteorina, pirrolnitrina y cianuro de hidrógeno (26), Acido indol acetico, 1 aminociclopropano – 1carboxilato (ACC) desaminasas, ácido glucónico y HCN. Varios de estos compuestos tienen fuertes efectos en contra de hongos fitopatógenos como *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Alternaria alternata*(10,28,43,44).

2.5 Aromáticas en Colombia

Las plantas aromáticas, por definición, son aquellas que desprenden de sus hojas o flores un aroma más o menos intenso. Generalmente, están recubiertas total o

parcialmente por esencias y estas representan alrededor de un 0,7% del total de las plantas medicinales (45).

Actualmente las plantas aromáticas, que se usan como condimento y otras que se les atribuye efectos medicinales, experimentan un auge en la demanda a tal punto de ser de gran interés en el mercado. Se estima que, de prestarles la atención y la importancia necesarias, podrían tener una gran posibilidad en el mercado mundial, además de generar empleos y ganancias para el país. En este momento la oferta colombiana de plantas aromáticas es muy pobre y rústica, ya que los agricultores se concentran en pequeñas parcelas y se dedican principalmente a la venta informal (46).

Para todo tipo de plantas, una disminución de pocos grados produce un cambio significativo en la tasa de su crecimiento y en la producción de metabolitos. En general, las bajas temperaturas reducen todas las etapas del ciclo de vida de las plantas. Sin embargo, hay determinadas etapas que necesitan temperaturas bajas para que ocurran como, por ejemplo: inducción e incremento de la floración, germinación, inducción y término de la dormancia en semillas y yemas, formación de tubérculos de papa, bulbos y cormos. Aunque hay que tener en cuenta que, si las temperaturas bajas persisten, pueden tener efectos completamente negativos en el organismo vegetal.

Los daños por bajas temperaturas como el frío y la congelación pueden producirse en todas las plantas, pero los mecanismos y la tipología del daño varían considerablemente. Algunos cultivos experimentan daños fisiológicos cuando están sometidos a temperaturas por debajo de +12,5°C, (bastante por encima de las temperaturas de congelación). Sin embargo, el daño por encima de 0 °C puede tener graves consecuencias en la integridad de la planta. Ésta ocurre en la mayoría de las plantas debido a la formación de hielo. Durante los periodos fríos, las plantas tienden a endurecerse contra el daño por congelación, y pierden el endurecimiento después de un período de calentamiento. El endurecimiento está relacionado, probablemente, con el aumento del contenido de solutos en el tejido de las plantas.

El daño por heladas ocurre cuando se forma hielo dentro del tejido de las plantas, dañando sus células. Los daños por heladas tienen un efecto drástico para la planta entera o pueden afectar únicamente a una pequeña parte del tejido de la planta, lo cual

reduce el rendimiento o deprecia la calidad del producto; esto claramente reduce los ingresos de los agricultores que viven del cultivo de aromáticas (25)

2.6 Taxonomía y características de las aromáticas a evaluar

Para este trabajo se eligieron dos plantas aromáticas sobre las cuales se quieren probar las bacterias psicrófilas provenientes de la Antártida para mirar su actividad de promoción y desarrollo: la menta y la albahaca, que crecen en climas templados/cálidos y son susceptibles a heladas. Estas especies de plantas pueden ser útiles para evidenciar si las bacterias promotoras pueden proveer nutrientes y proteger a la planta debido que la rizosfera en suelos fríos, montañosos carecen de riqueza microbiana.

Menta

Conocida en la comunidad científica como *Mentha piperita* L. En este género existe también la *Mentha spicata* que se conoce como yerbabuena y con la cual se confunde la Menta. Sus características son similares. Se diferencian porque la Menta tiene un color más verde en sus hojas y tienen forma redondeada. El tallo de la menta es más rojizo y el aroma que expide es más intenso. Es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Labiadas, esta se caracteriza por presentar raíces y brotes laterales muy superficiales, la planta es capaz de alcanzar los 90 cms de altura; Sus hojas son verdes, ovaladas, pecioladas y con bordes aserrados. Tiene flores de color rosa que desprenden un olor bastante agradable, sin embargo, el mayor potencial son sus hojas que son frecuentemente utilizadas en aplicaciones culinarias o en medicina ancestral.

La plantación de Menta, como la de Yerbabuena, se realiza generalmente en los meses de marzo a abril, se riega regularmente con poca agua y se recolectan aproximadamente a los dos meses de la plantación de los cultivos poco antes de que la planta entre en floración.

Las plantas prefieren climas húmedos y templados para su desarrollo normal y buena iluminación. Por otro lado, se sabe que es una planta bastante sensible al frío. Por esto,

se debe mantener cubierta ante los cambios bruscos de temperatura. Aun así, es una planta que se adapta a una gran variedad de suelos, es poco exigente, pero el suelo ideal se caracteriza porque son ligeros, ricos en materia orgánica y una humedad controlada (47,48).

Albahaca

Conocida en la comunidad científica como *Ocimum basilicum*. Es una planta aromática perteneciente a la familia de las Labiadas que crece con una longitud de 20-40 cms, con tallos erectos y ramificados. Con hojas grandes y de color verde y flores de color blanco/rosáceo que son generalmente usadas en la industria farmacéutica, culinaria, licorera entre otros.

Actualmente, las semillas de Albahaca se siembran directamente en la tierra y se riegan con regularidad. Las flores se cortan para favorecer el crecimiento de las hojas. La germinación se inicia a los 10 o 12 días y se replican cuando tienen de 4 a 6 hojas; la cosecha de las hojas se realiza de junio a septiembre. Sin embargo, estas fechas pueden variar dependiendo de cuando se cumpla un año luego de ser cultivadas.

Generalmente, los cultivos de albahaca se realizan en climas templados o cálidos, sin variaciones bruscas de temperatura. Las plantas suelen preferir lugares abrigados y soleados con suelos ligeros, húmedos, bien drenados y ricos en materia orgánica (6,49)

2.7 Principales causas de pérdidas de cultivos de aromáticas

Heladas

Las heladas se definen como la presencia de temperatura igual o menor a 0 grados, a una altura de 2 metros sobre el nivel del suelo. A estas temperaturas, las plantas comienzan a sufrir daño celular por la congelación de la sabia y el agua externa de las mismas provocando marchitamiento y su consiguiente muerte.

Se han definido diferentes tipos de heladas, sin embargo, en las regiones tropicales que tienen suelos ubicados a 2,500 metros sobre el nivel del mar como es el caso de la sabana de Bogotá, los valles de Ubaté, Chiquinquirá y otros espacios de las sábanas cundiboyacenses, suceden heladas radiactivas no producidas por radiación, sino que

sucede por la pérdida de calor que sufren las plantas y el suelo cuando desciende la temperatura en las noches y el vapor de agua se deposita sobre la superficie de la planta y forma una capa blanca de hielo denominada escarcha (50,51).

El daño celular en la planta se produce cuando se forman cristales de hielo dentro del protoplasma; se cree que la formación de hielo intracelular causa una ruptura mecánica de la estructura celular. La severidad del daño depende de la rapidez del enfriamiento y de la intensidad del frío antes de congelarse. Se sugiere a los agricultores que tomen métodos de protección de cultivos para asegurar su supervivencia (52,25).

Generalmente, las heladas se presentan en los primeros 20 días de enero y en la segunda mitad de diciembre y enero, sin embargo, también pueden presentarse en más meses del año de manera esporádica.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de investigación: investigación de tipo cuantitativa y descriptiva

Universo: Microorganismos psicrófilos y plantas aromáticas.

Población: Microorganismos bacterianos provenientes de glaciares en la Antártida y plántulas aromáticas susceptibles al frío.

Muestra: Tres microorganismos psicrófilos elegidos para el bioensayo y plántulas de Menta y Albahaca.

3.2 Hipótesis, variables e indicadores

Hipótesis: Las bacterias psicrófilas de la Antártida pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes en condiciones adversas de temperatura y estimular el desarrollo y crecimiento de las plantas aromáticas de Menta y Albahaca.

Tabla 1: Variables e indicadores

Tipo de variable	Indicadores
Actividad bioquímica	Bacterias fijadoras de nitrógeno.
	Bacterias solubilizadoras de fosfato.
Temperatura de crecimiento	Plántulas a cielo abierto en temperatura ambiente que se presente mientras se realiza el ensayo
	Plántulas protegidas de cambios drásticos de temperatura
Crecimiento vegetal	Longitud del tallo.
	Longitud de la raíz.
	Crecimiento foliar.
	Aspecto
	Número de hojas.

3.3 Técnicas y procedimientos

Etapa 1: Estabilización de las cepas congeladas y verificación de la funcionalidad bioquímica in vitro relacionada con crecimiento y desarrollo de plantas

Esta etapa incluyó los siguientes procedimientos:

- Reactivación de cepas psicrófilas aisladas de los suelos de la isla Livingston de la Antártida en agar LB.
- Coloración de Gram para verificar morfología y su clasificación según Gram.
- Morfología Macroscópica
- Funcionalidad en medios específicos

Se reactivaron 19 cepas de bacterias psicrófilas para observar su crecimiento inicial; se realizaron Coloración de Gram y los microorganismos que demostraron pureza y viabilidad fueron llevados a medios específicos. Así:

Agar leche: el agar leche se utilizó para observar la actividad proteolítica de las bacterias a evaluar, el medio es rico en caseína que es una fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. Cuando se mezcla la leche con el medio de cultivo, el medio pierde su transparencia y se vuelve turbio debido a que la caseína reacciona con los iones calcio del medio y forma complejos de moléculas insolubles de caseinato de calcio. Cuando la enzima caseinasa cataliza la hidrólisis de la caseína, los aminoácidos resultantes se disuelven en el medio tornándolo transparente nuevamente alrededor de la colonia del microorganismo. (53)

El medio comercial se compone de diferentes compuestos: Triptona 5,00 g/l, Extracto de levadura 2,50 g/l, Leche descremada 1,00 g/l, Dextrosa 1,00 g/l y Agar 10,50 g/l. (54)

Agar almidón: es un medio rico en almidón (polímero de glucosa) el cual es un compuesto es muy complejo para la asimilación bacteriana, para poder ser utilizado deben hidrolizarse en sustancias más simples y asimilables. Un gran número de microorganismos son capaces de hidrolizar el almidón con formación de maltosa. La maltosa es capaz de ingresar a la célula para ser utilizada. Se verifica su presencia por crecimiento y reacción frente al Lugol, ya que actúa como revelador mostrando un color café/purpura que desaparece cuando el almidón ha sido degradado. (55)

El medio comercial se compone de: Peptona 5.00 g/l, Cloruro de Sodio 5.00 g/l, Extracto de levadura 1.50 g/l, Almidón soluble 2.00 g/l y Agar 15.00 g/l. (56)

Agar Pikovskaya: el agar es recomendado para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfato, el fosfato está disponible de varias formas en el suelo, Los fosfatos del suelo están disponibles ya sea por las raíces de las plantas o por los

microorganismos del suelo. El extracto de levadura y las diferentes sales le proporcionan nitrógeno y otros nutrientes necesarios al medio. Las bacterias solubilizadoras forman un halo claro alrededor de este medio debido a la solubilización del fosfato por medio de enzimas como las fosfatasas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico.

El medio comercial se compone de: glucosa 10.0 g/l, fosfato de calcio 5.0 g/l, sulfato de amonio 5.0 g/l, cloruro de potasio 0.2 g/l, sulfato de magnesio 0.1 g/l, extracto de levadura 0.5 g/l y agar 15.0 g/l. (57,58)

Agar Ashby: este agar es un medio de cultivo libre de nitrógeno, el cual, se emplea para el aislamiento de microorganismos con capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico. Si la bacteria a evaluar crece en el medio, significa que son organismos que poseen la enzima nitrogenasa, convierten el nitrógeno en formas de amonio para que pueda ser aprovechado, además puede usar el manitol y el nitrógeno atmosférico como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. Todas estas características se verifican por el crecimiento del microorganismo. (59,60)

El medio comercial se compone de sacarosa/manitol 5.0 g/l, Fosfato monopotásico 1.0 g/l, Sulfato de magnesio 0.2 g/l, Sulfato ferroso 0.005 g/l, Cloruro de sodio 0.2 g/l, Cloruro de calcio 0.2 g/l y agar 15.0 g/l. (61)

Agar asparagina: este es un medio de cultivo que se basa en la hidrólisis de la asparagina a ácido aspártico para poder ser de ayuda en la identificación y caracterización de la bacteria. El medio cuenta con una base de asparagina como única fuente de nitrógeno y de glicerol como única fuente de carbono. Se verifica por crecimiento del microorganismo. El medio comercial se compone de fosfato monopotásico 10.0 g/l, fosfato di potásico, 1.0 g/l, Asparagina 2.0 g/l y sulfato magnésico 0.5 g/l. (62)

En la figura 1 se resumen los procedimientos de la etapa 1.



Figura 1: Procedimiento en laboratorio para valorar la capacidad bioquímica in vitro. Buitrago,2022.

Etapa 2: Desarrollo del bioensayo en plantas aromáticas susceptibles al frío. Ver figura 2.

Una vez seleccionadas las bacterias por los resultados obtenidos en la etapa anterior se procede como se describe a continuación:

- Preparación de soluciones de las tres bacterias seleccionadas en 100 ml de agua peptonada a una escala de 1 McFarland para inocular las plantas.
- A cada plántula se le agregaron 8 ml de la solución, excepto a los controles.
- El número total de las plantas en el experimento fue de 44: 22 plántulas de menta y 22 de albahaca con 6 repeticiones para cada una de las 3 bacterias seleccionadas, con un total de 18 repeticiones para menta y 18 para albahaca.

Tres plántulas se utilizaron como control a cielo abierto para cada una de las variedades de aromáticas.

Dos plántulas de cada variedad para el control en condiciones protegidas para garantizar que el lote de plántulas estaba sano y comparar su crecimiento y desarrollo con las que estaban expuestas a cielo abierto.

Condiciones de siembra de las plántulas:

Suelo con gallinaza y cascarilla de arroz, para lograr características óptimas del suelo que facilitaran la aireación, humedad y filtración de nutrientes. Además, todos los bioensayos fueron regados con agua corriente cada día de por medio, verificando que la tierra en donde crecen estuviera con un aspecto húmedo todo el tiempo.

Época en la que se desarrolló el experimento

El experimento inició el 4 de diciembre del año 2021 y finalizó el 15 de enero del año 2022 ya que esta época se caracteriza por fluctuaciones de temperaturas y por la presencia de heladas según informes de la CAR (51).

Fechas en que se realizaron las lecturas

Las lecturas se realizaron en 4 fechas cada 2 semanas iniciando el 4 de diciembre del 2021, la segunda lectura se realizó el 18 de diciembre del mismo año, la tercera y cuarta lectura se hicieron el día 1 y 15 respectivamente del mes de enero del 2022.

Condiciones de temperatura

Las condiciones de cielo abierto fueron tomadas diariamente en el día a la 1 pm y en la noche a las 8 pm con ayuda del aplicativo “AccuWeather” para observar e identificar variaciones y fluctuaciones a lo largo del tiempo del experimento.

Sistema de riego

Las plantas se regaron diariamente una vez al día asegurando que todo el tiempo el suelo se encontrara húmedo, pero evitando “encharcarla”, siguiendo las recomendaciones de Castro y su equipo en el libro “Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales” (50).

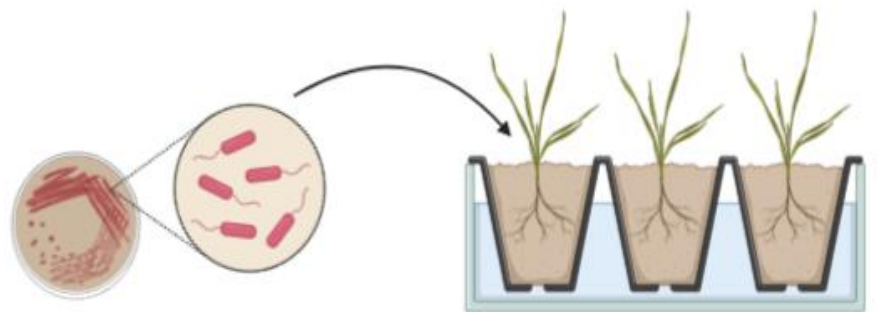


Figura 2: Procedimiento bioensayo en plantas aromáticas. Buitrago,2022.

Tabla 2: Modelo para el bioensayo con plantas aromáticas

2

Bioensayo con las plántulas

6 plántulas se dejan sin inocular para ser usadas como control.

	AL-10	AL-11	AL-16	Total
Menta	6 repeticiones/ 1 control	6 repeticiones/ 1 control	6 repeticiones/ 1 control	21 plántulas
Albahaca	6 repeticiones/ 1 control	6 repeticiones/ 1 control	6 repeticiones/ 1 control	21 plántulas
Total	14 plántulas	14 plántulas	14 plántulas	42 plántulas en total

Abreviaturas AL (Aislamientos isla Livingston)

Para verificar el crecimiento y desarrollo de las plántulas se midieron las siguientes variables al inicio, en el tiempo del ensayo y al finalizar el ensayo. Las cuales se observan a continuación en la tabla 3

Tabla 3: Variables medidas

Inicio del ensayo 04/12/21	Durante del ensayo 05/12/21-14/01/22	Final del ensayo 15/01/22
Longitud del tallo en cms	Longitud del tallo en cms	Longitud del tallo en cms
Crecimiento foliar en cms	Crecimiento foliar en cms	Crecimiento foliar en cms
Aspecto	Aspecto	Aspecto
Número de hojas	Temperatura	Temperatura
	Número de hojas	Número de hojas
		Longitud de la raíz en cms

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de los microorganismos:

El resultado de la descongelación y reactivación de las 19 cepas bacterianas, las características microscópicas y macroscópicas, se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 4: Características de los microorganismos aislados

Nombre	Características	Gram
AL-1	Colonias pequeñas amarillas. Mucosas.	Bacilos Gram positivos
AL-2	Colonias planas color amarillo crema.	Bacilos Gram Positivos
AL-3	Colonias muy pequeñas puntiformes, amarillas.	Bacilos Gram Negativos
AL-4	Colonias medianas, planas de aspecto rugoso, color blanco.	Cocos Gram Negativos
AL-5	Colonias grandes color piel con centro más oscuro, planas, bordes definidos.	Bacilos Gram Negativos largos
AL-6	Colonias puntiformes, pequeñas, transparentes con centro amarillo.	Cocos Gram Positivos
AL-7	Colonias puntiformes, medianas, amarillas.	Cocos Gram Positivos

AL-8	Colonias pequeñas blancas cremosas.	Bacilos Gram positivos
AL-9	Colonias grandes planas color amarillo opaco.	Bacilos Gram Negativos
AL-10	Crecimiento reducido, colonias grandes, redondas con bordes definidos, color blanco, cremosas.	Bacilos Gram Negativos
AL-11	Colonias medianas, blancas, cremosas y mucosas brillantes.	Bacilos Gram Positivos
AL-12	Colonias puntiformes, medianas, amarillas.	Bacilos Gram Positivos
AL-13	Colonias puntiformes amarillas, brillantes.	Cocos Gram Negativos
AL-14	Colonias amarillas cremosas, mucosas.	Bacilos Gram Positivos
AL-15	Colonias amarillas cremosas, mucosas.	Bacilos Gram Negativos
AL-16	Colonias medianas transparentes, planas con centro elevado	Cocobacilos Gram Negativos
AL-17	Colonias puntiformes, transparentes, brillantes.	Cocobacilos Gram Negativos

AL-18	Colonias grandes, amarillo pálido, brillantes y planas.	Bacilos Gram Negativos
AL-19	Colonias medianas, amarillo cremoso, brillantes.	Bacilos Gram Positivos

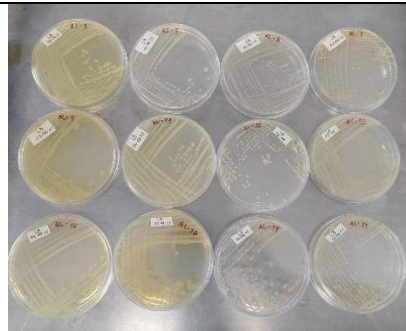


Figura 3: Crecimiento de las cepas a estudiar. Buitrago,2021.

4.2 Pruebas funcionales in vitro:

Para determinar que microorganismos aislados de la isla Livingston (AL) serían utilizados en el bioensayo se realizaron pruebas funcionales en medios de cultivo específicos para conocer su actividad bioquímica mediante la fijación del nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfatos, actividad proteolítica y amilolítica.

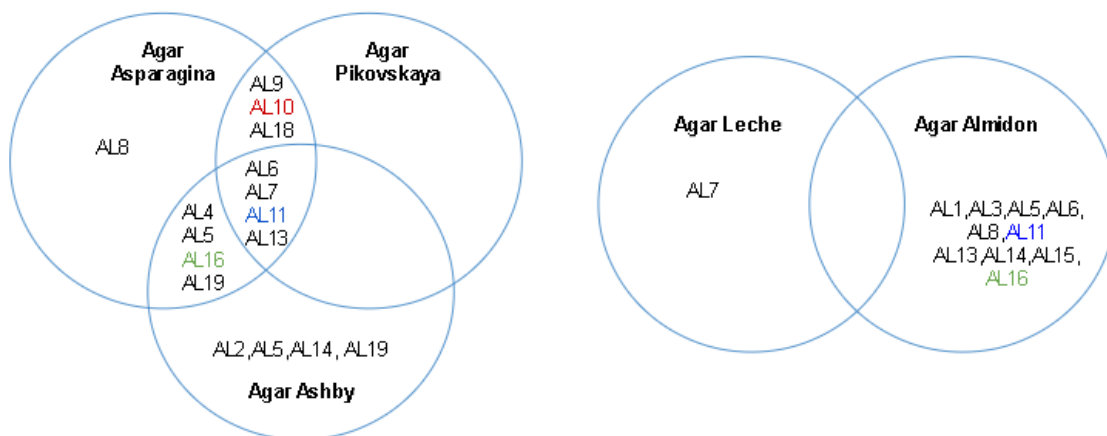


Figura 4: Crecimiento de microorganismos psicrófilos aislados de la isla Livingston (AL) en medios específicos. Sánchez, Henao y Buitrago ,2021.

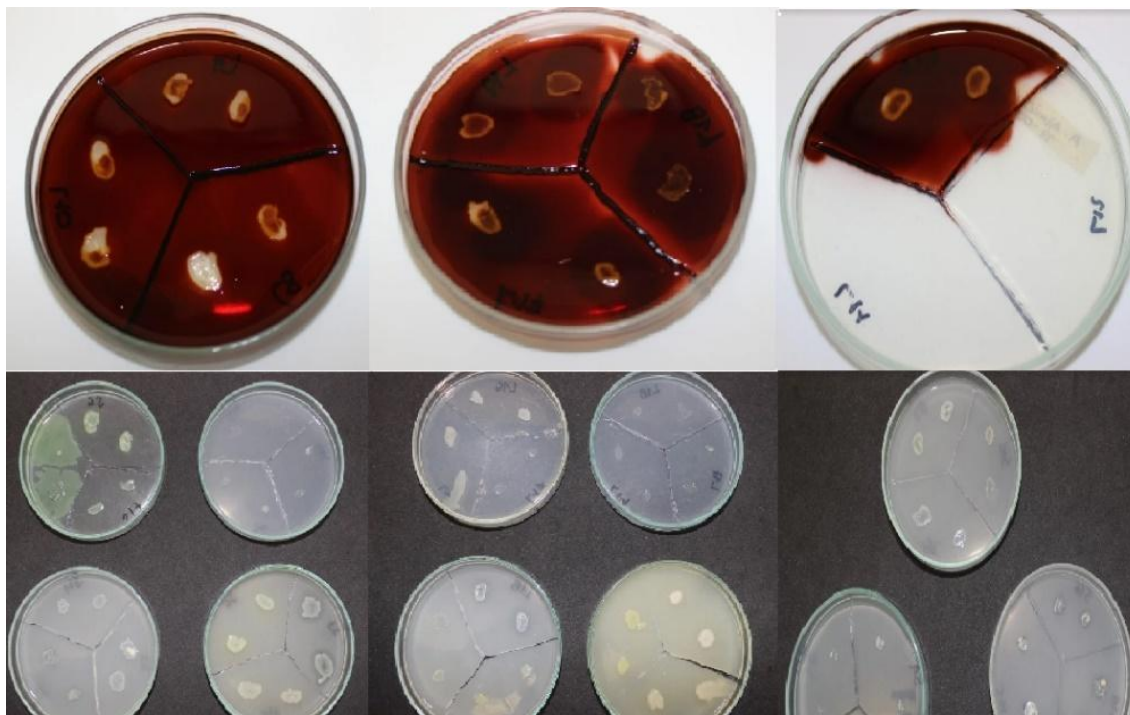


Figura 5: Características de algunos microorganismos psicrófilos en medios específicos (Almidón, Ashby, Asparagina). Sánchez, Henao y Buitrago ,2021.

Tabla 5: Características de los microorganismos aislados en medios específicos

Bacteria	Agar Pikovskaya	Agar Ashby	Agar Leche	Agar Almidón	Agar Asparagina
AL-1	Sin halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-2	Sin halo	Crecimiento	Sin halo	Sin halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-3	Sin halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-4	Sin halo	Crecimiento	Sin halo	Sin halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-5	Sin halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-6	Halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento con fluorescencia

AL-7	Halo	Crecimiento	Halo	Sin halo	crecimiento con fluorescencia
AL-8	Sin halo	Sin crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento con fluorescencia
AL-9	Halo	Sin crecimiento	Sin halo	Sin halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-10	Halo	Sin crecimiento	Sin halo	Sin halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-11	Halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-12	Sin halo	Sin crecimiento	Sin halo	Sin halo	Sin crecimiento
AL-13	Halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento con fluorescencia
AL-14	Sin halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	Sin crecimiento
AL-15	Halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento con fluorescencia
AL-16	Sin halo	Crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento con fluorescencia
AL-17	Sin halo	Sin crecimiento	Sin halo	Halo	Sin crecimiento
AL-18	Halo	Sin crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento sin fluorescencia
AL-19	Sin halo	Sin crecimiento	Sin halo	Halo	crecimiento sin fluorescencia

A partir de los pruebas y aislamientos realizados Las tres bacterias que se eligieron fueron las que presentaron fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos o ambos, ya que estos procesos son vitales para el desarrollo de las plántulas.

Debido a la buena funcionalidad que presentaron los aislamientos 10,11 y 16 de la isla Livingston (AL) fueron elegidos para la siguiente fase, además de que gracias a trabajos anteriores realizados por el semillero NEONATURE se contaba con su identificación molecular perteneciendo así a los géneros *Brevundimonas* sp (AL10), *Arthrobacter* sp (AL11) y *Pseudomonas* sp (AL16).

4.3 Bioensayo con plantas de Albahaca y Menta

A Continuación, se presentan los resultados de las mediciones, en los tiempos en que se determinaron hacer las lecturas y que se presentan en la metodología:

En la primera medición, todas las plántulas de menta y albahaca mostraron un crecimiento positivo ante el estímulo de la inoculación de las plantas, tenían un color verde saludable y no presentaron pérdida de las hojas o deterioro de algún tipo, aunque las temperaturas fueron disminuyendo. (figura 6 y 7)

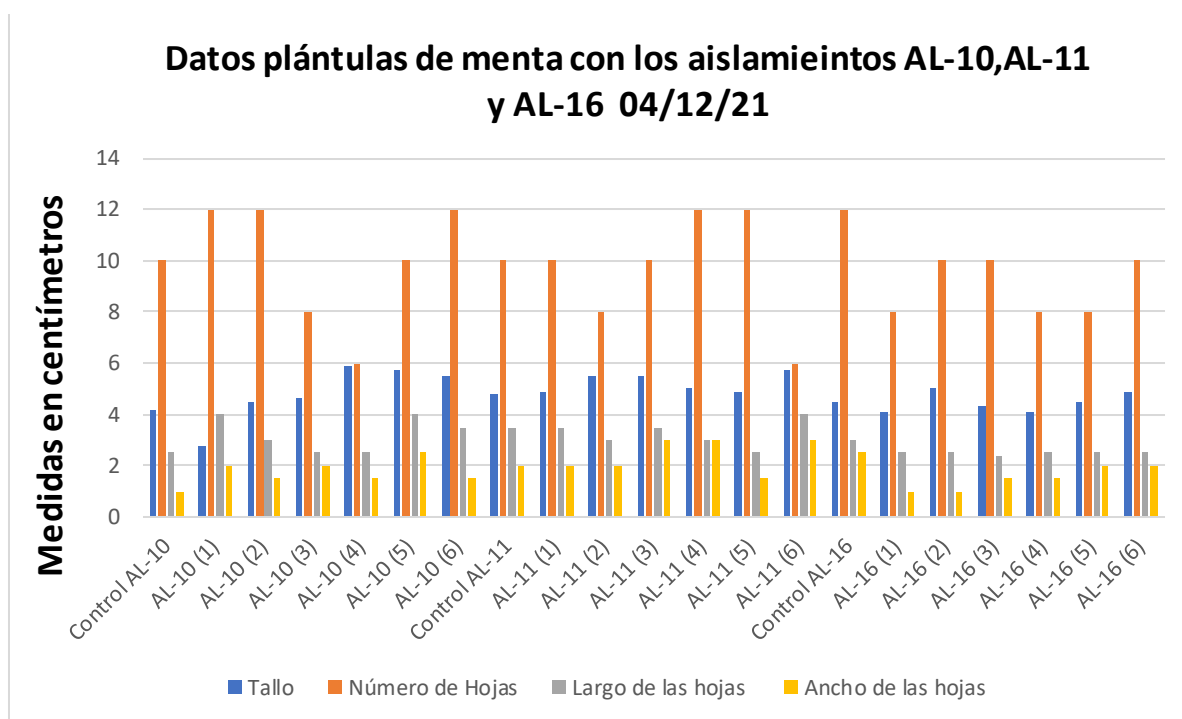


Figura 6: Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 04/12/21. Buitrago,2022.

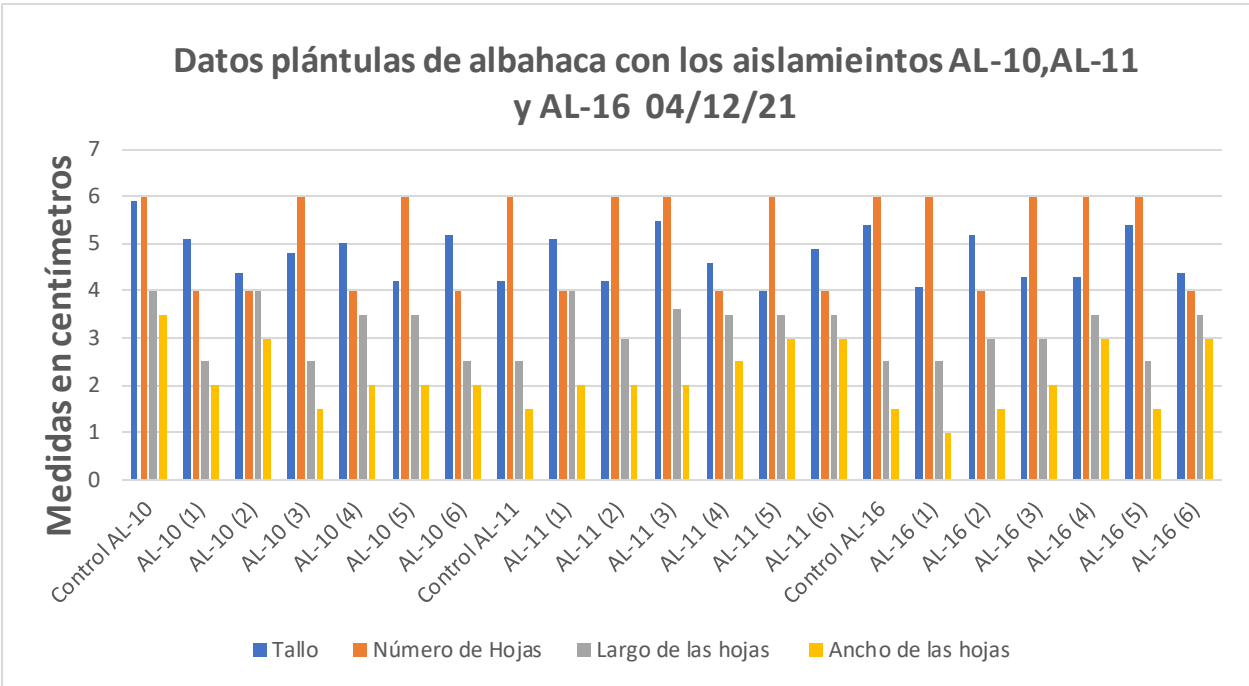


Figura 7: Datos de crecimiento de plántulas de albahaca, revisión 04/12/21. Buitrago,2022.

En la segunda medición, todas las plántulas siguieron el mismo patrón, un crecimiento vigoroso y no presentaron ningún síntoma desfavorable, incluso con la caída de la temperatura en la tarde/noche. (figura 8 y 9).

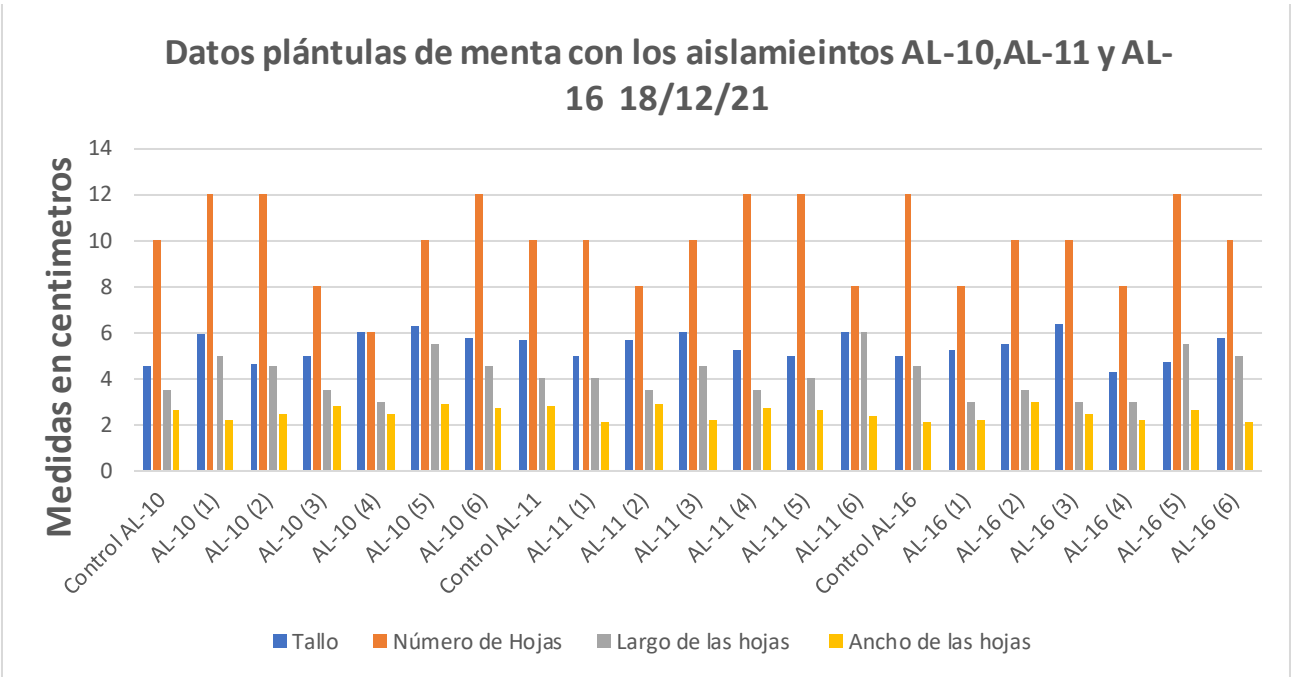


Figura 8: Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 18/12/21.
Buitrago,2022.

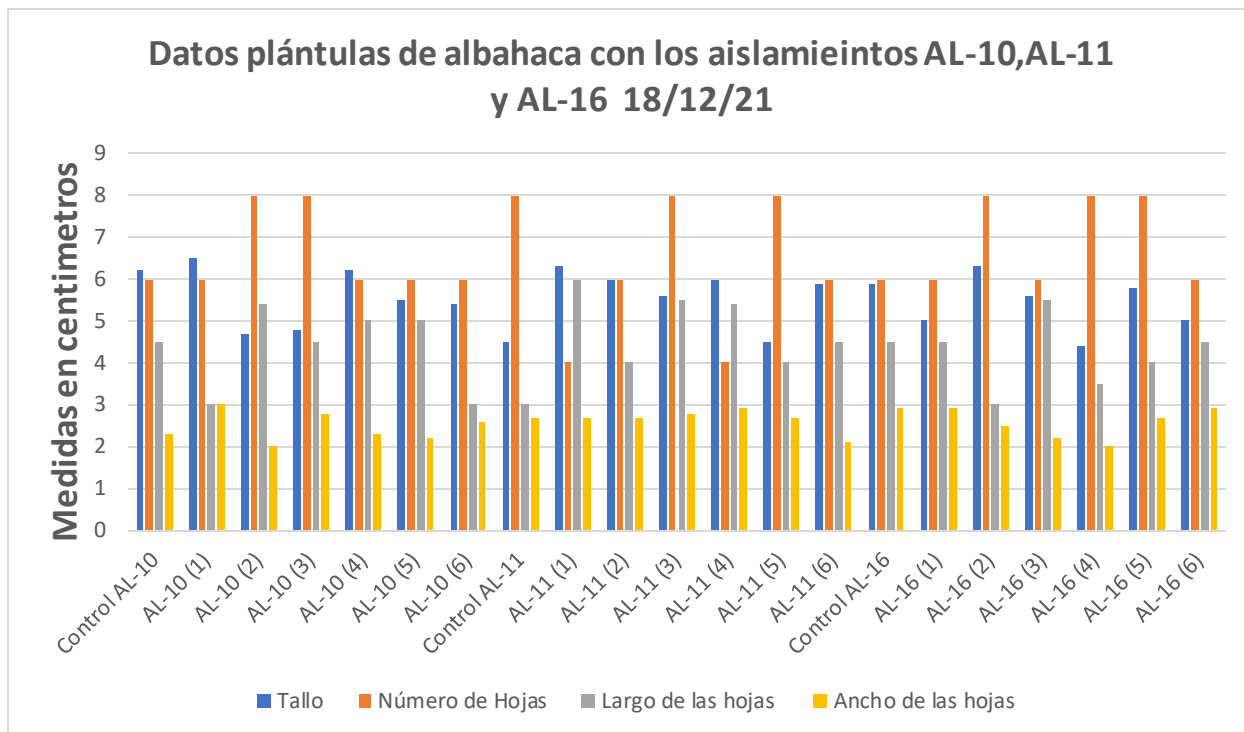


Figura 9: Datos de crecimiento de plántulas de albahaca, revisión 18/12/21.
Buitrago,2022.

Antes de llegar a la tercera medición, la temperatura bajó en las noches y las madrugadas considerablemente y las plántulas presentaron deterioro y pérdida de vitalidad: las hojas comenzaron a reducir su tamaño y se tornaron decaídas y cloróticas en el caso de la albahaca. En la menta, fue evidente el cambio de color verde a pigmento morado, se intentó cambiar el sistema de riego para recuperar su vitalidad.

En la tercera medición el deterioro de todas las plántulas era evidente, no solo disminuyeron su crecimiento, si no que perdieron su color verde característico y comenzaron a presentar un deterioro en la estructura foliar. En un inicio, la aparición del deterioro no se presentó en todas las plántulas, pero poco a poco fueron adquiriendo características similares. (figura 10 y 11)

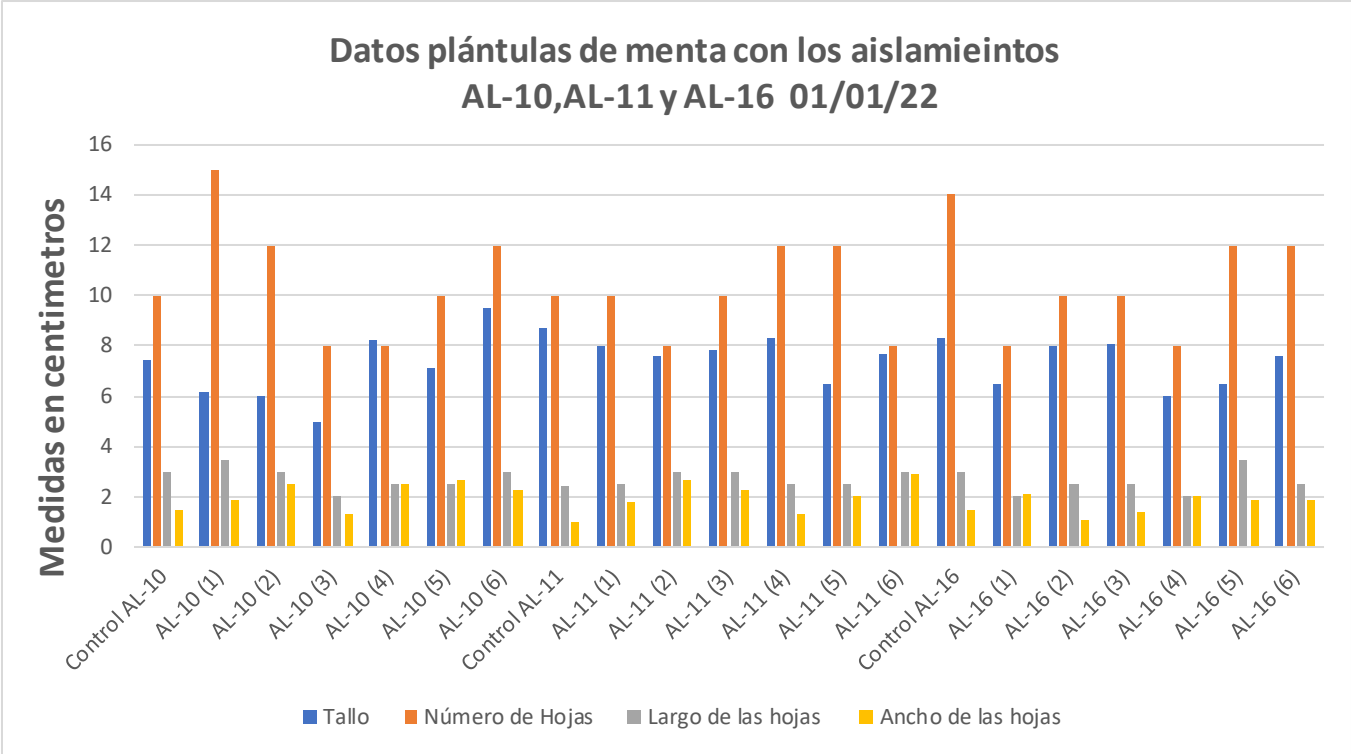


Figura 10: Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 01/01/21. Buitrago,2022.

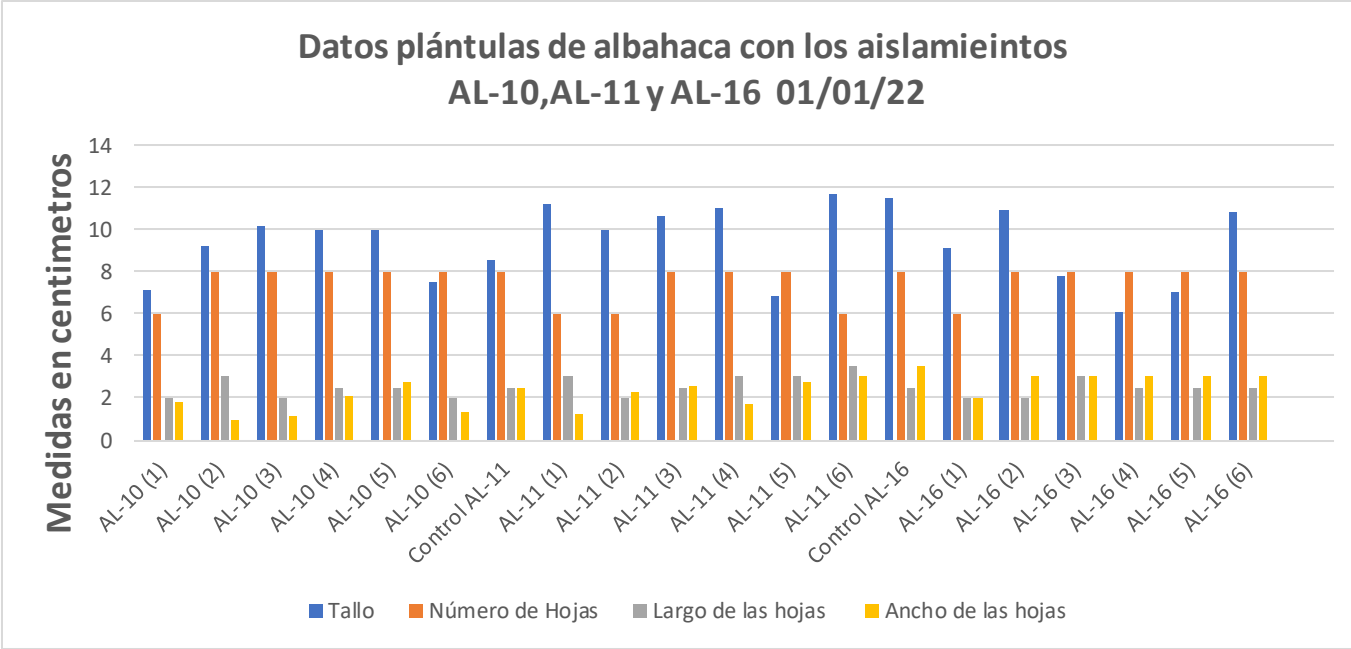


Figura 11: Datos de crecimiento de plántulas de albahaca, revisión 01/01/21. Buitrago,2022.

Para la cuarta y última medición, las condiciones no mejoraron, todas las plántulas en comparación a los controles tuvieron una diferencia evidente en su tamaño y sobre todo su vitalidad; las más afectadas fueron las plantas de menta ya que hubo defoliación en un 80% y el color se tornó morado. Por otro lado, aunque el crecimiento también se vio afectado en las plantas de albahaca, algunas pudieron llegar a etapa de floración aún con las condiciones tan variables del ambiente. (figura 12, 13 y 14).

En cuanto a los controles en condiciones protegidas, en las figuras 15 y 16 se observa la sanidad, crecimiento y desarrollo de las plántulas de menta y albahaca, verificando así que las condiciones de cambio que presentaron las plantas fueron por la exposición a las bajas de temperatura. Esto se verifica porque los controles sin microorganismos que estaban a cielo abierto también sufrieron el mismo daño. (figura 6)



Figura 12: Floración de planta de albahaca. Buitrago,2022.

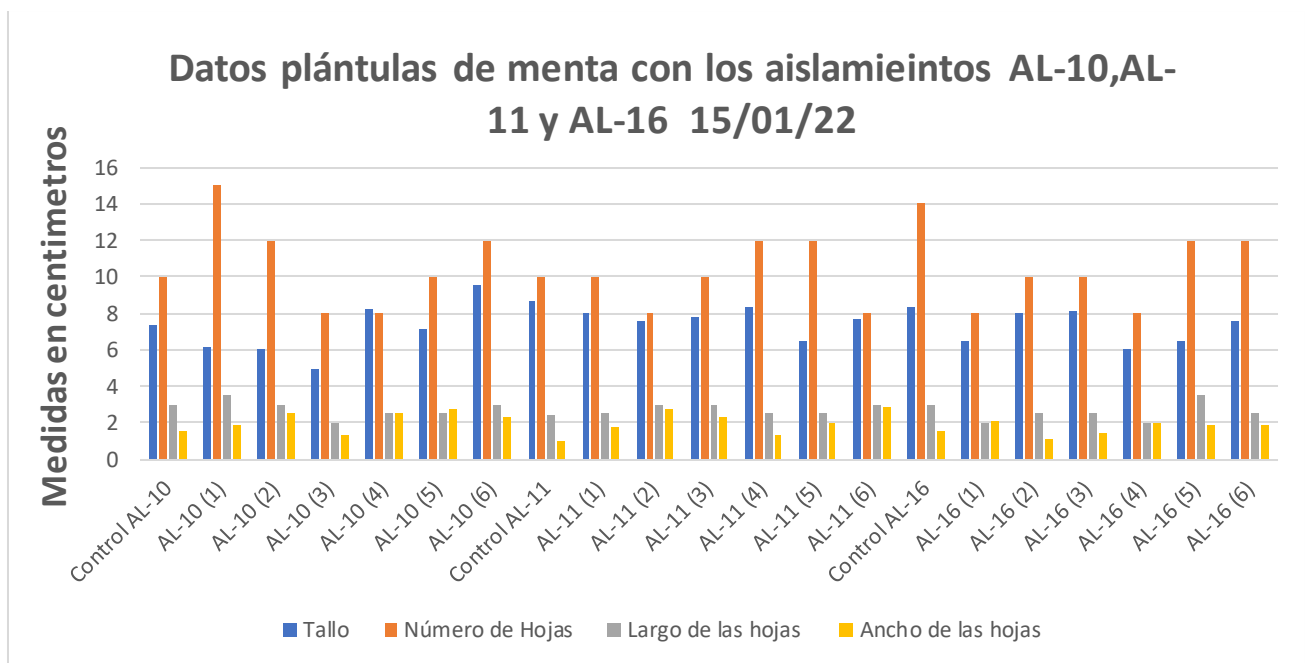


Figura 13: Datos de crecimiento de plántulas de albahaca, revisión 15/01/21. Buitrago,2022.

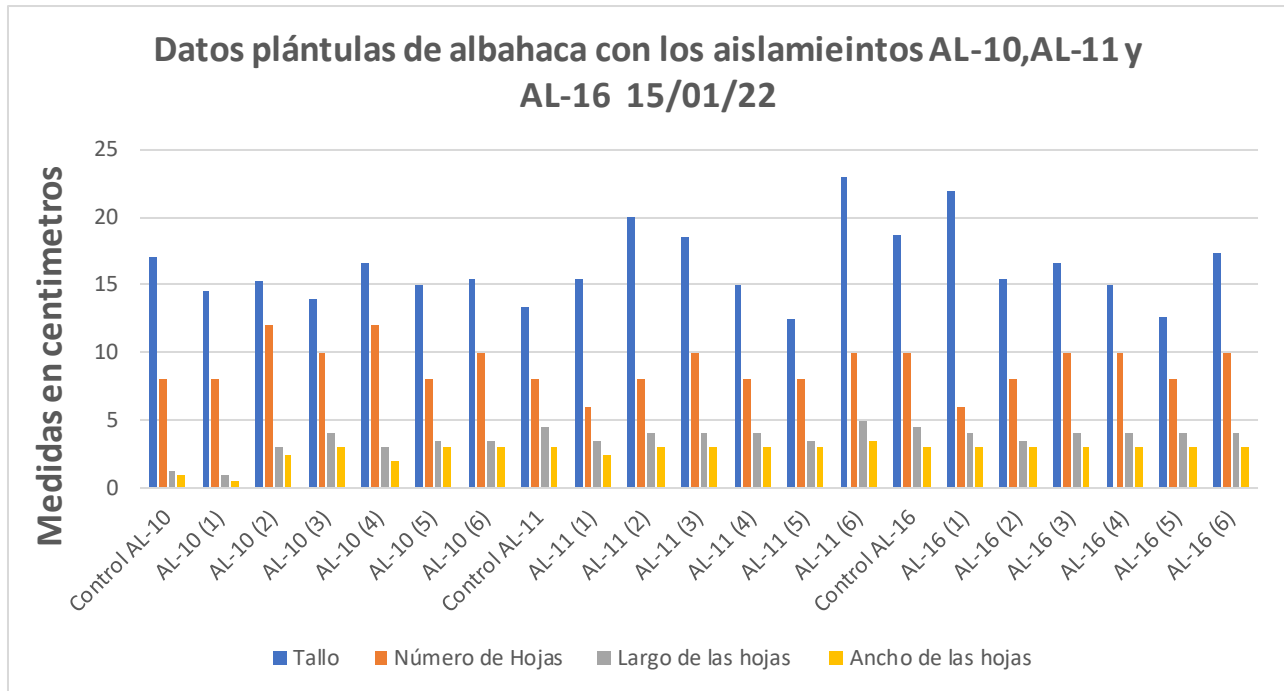


Figura 14: Datos de crecimiento de plántulas de menta, revisión 15/01/21. Buitrago,2022.

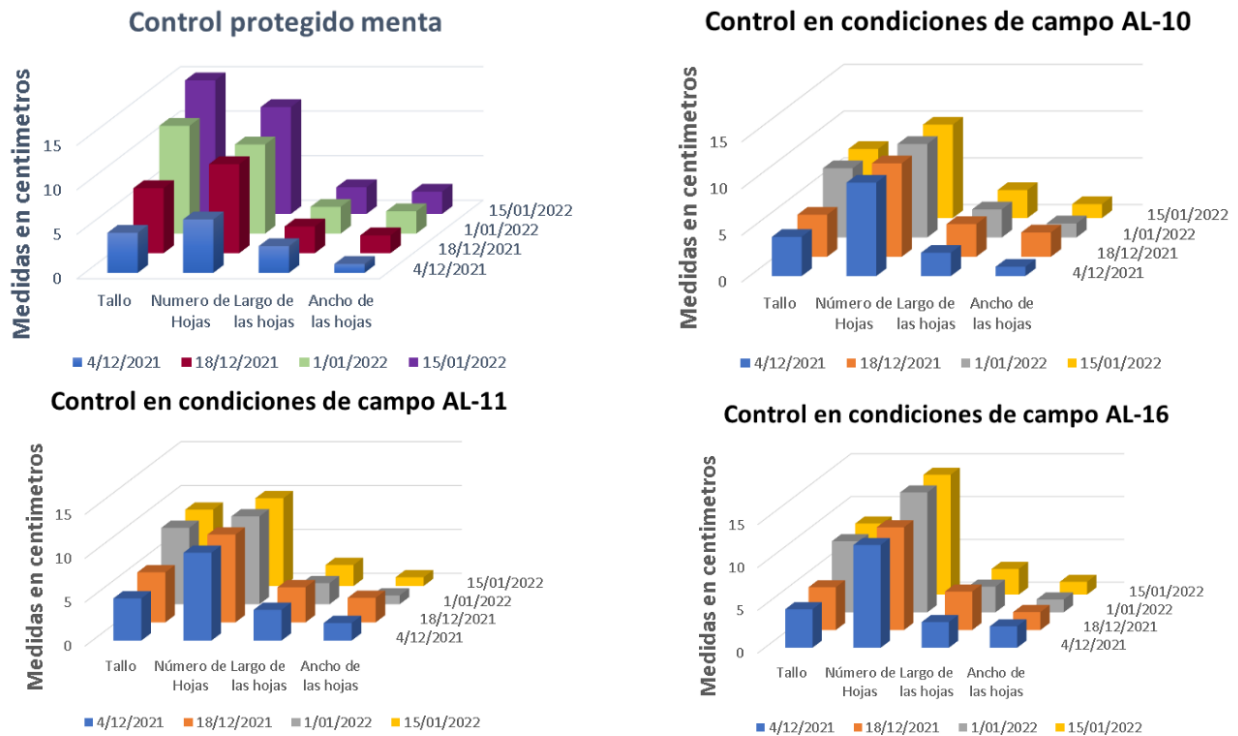


Figura 15: comparación datos de crecimiento de los controles de menta

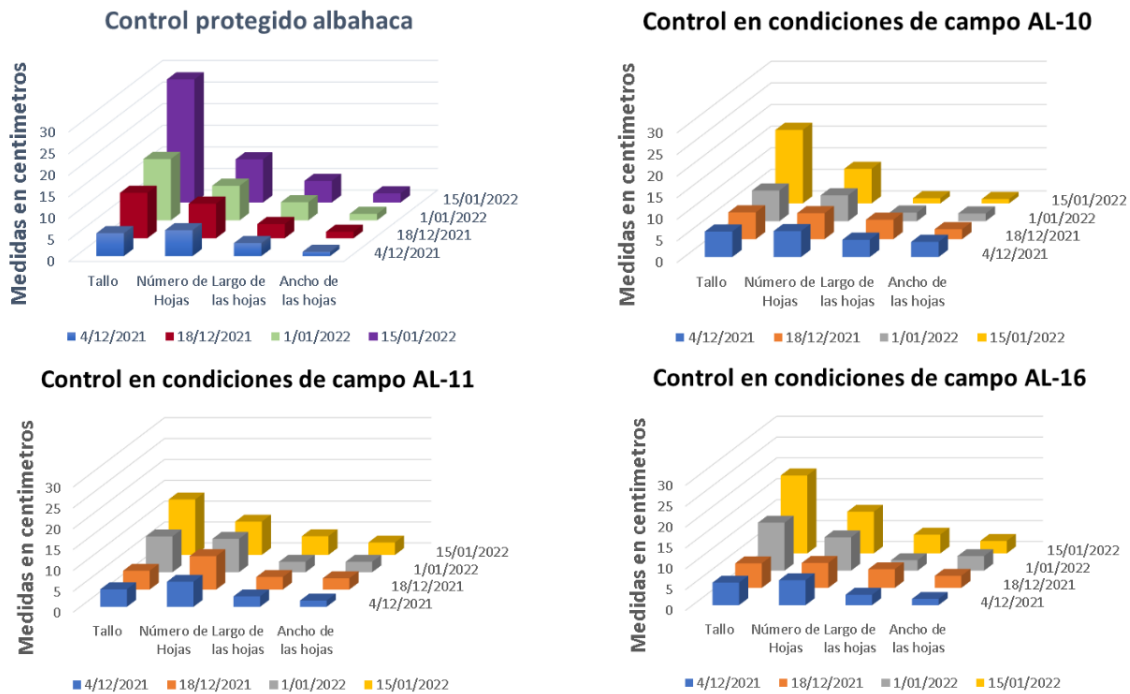


Figura 16: Comparación datos de crecimiento de los controles de albahaca

Otro parámetro importante que se tuvo en cuenta fue la longitud de la raíz, esta es una de las partes más importantes de la planta ya que tienen la función de fijar la planta al suelo y absorber agua, sales minerales y demás nutrientes. Dentro del bioensayo, las plántulas presentaron un incremento en la longitud de sus raíces e incluso algunas repeticiones llegando a acercarse a la longitud de la raíz del control positivo que no fue expuesto al frío, el cual, demostró la mayor longitud. (figura 17 y 18).

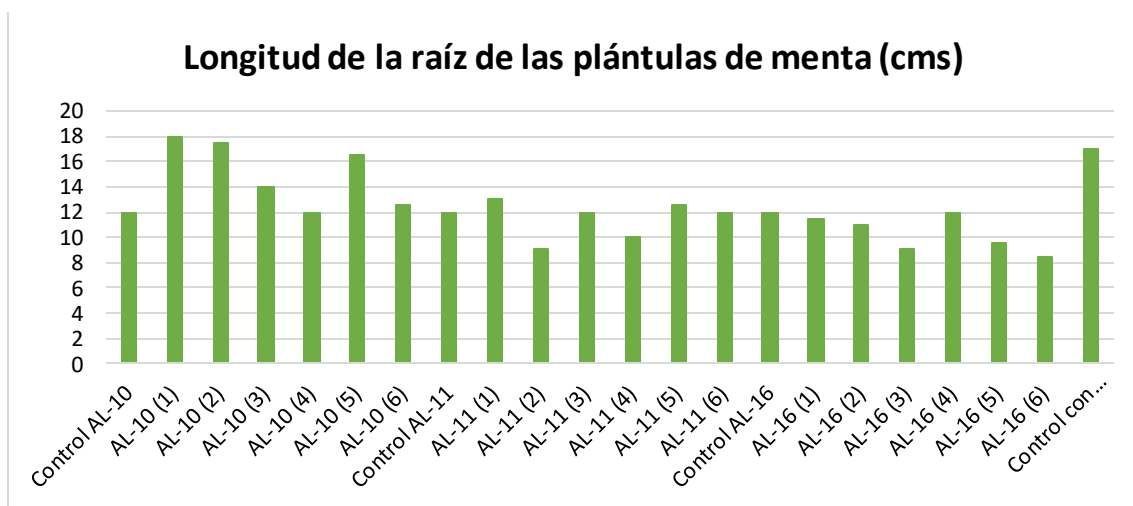


Figura 17: Datos de longitud de la raíz en cms menta. Buitrago,2022.

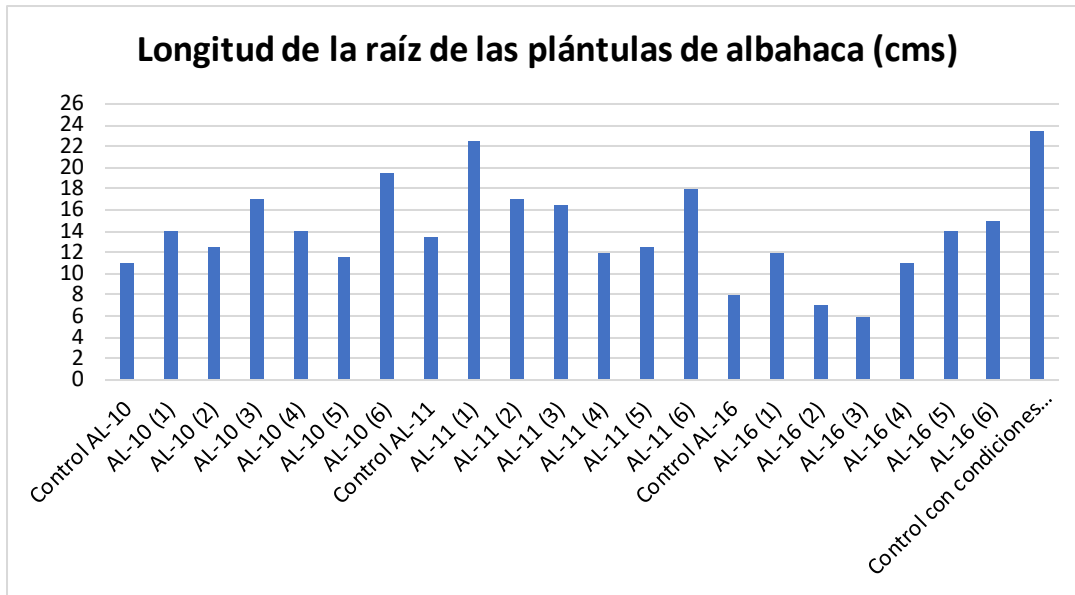






Figura 18: Datos de longitud de la raíz en cms albahaca. Buitrago,2022.

Tabla 6: Comparación de los controles protegidos y las repeticiones para las plántulas de albahaca y menta. Buitrago,2022.

	Albahaca	Menta
Control protegido		
Repeticiones AL 10		

<p>Repeticiones AL11</p>		
<p>Repeticiones AL 16</p>		

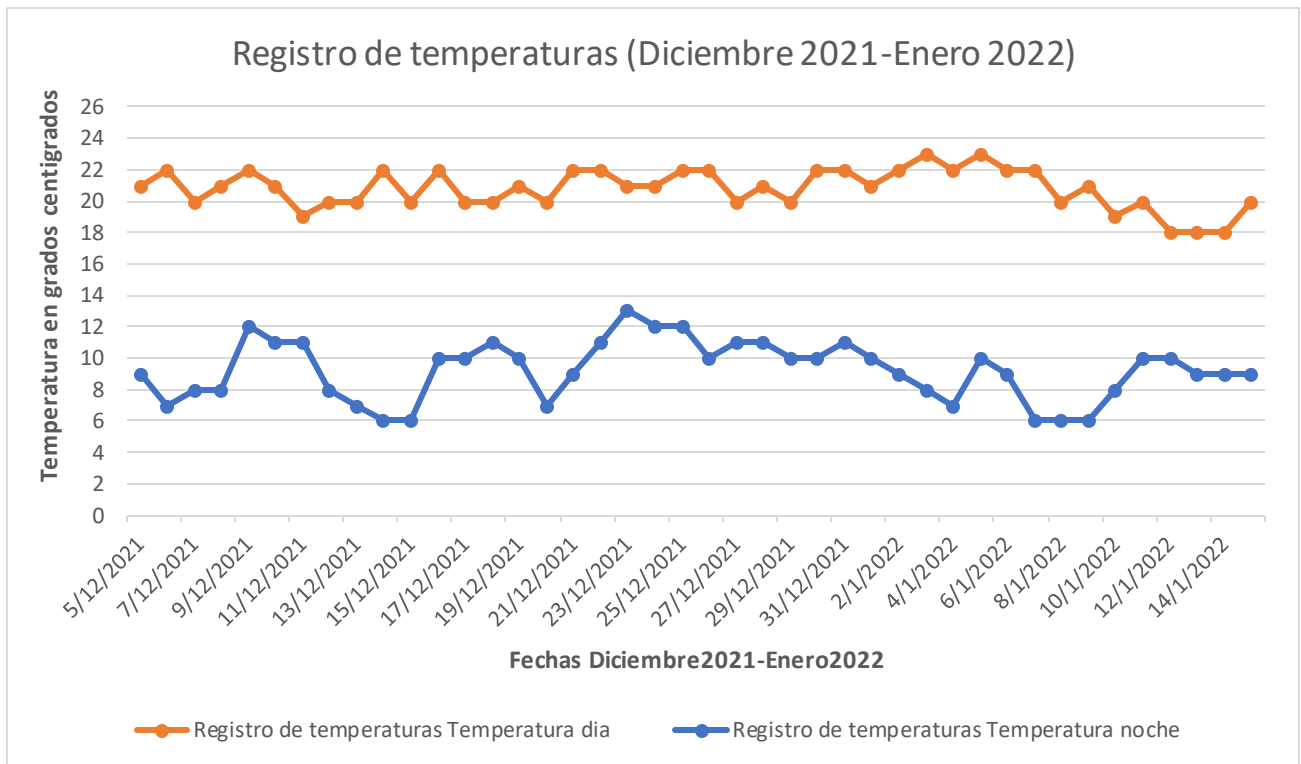


Figura 19: Registro de temperaturas diciembre 2021 - enero 2022. Buitrago,2022.

5 DISCUSIÓN

En los constantes intentos de mejorar el crecimiento vegetal en condiciones adversas para las plantas, una de las opciones más utilizadas actualmente es el uso de microorganismos que presentan la capacidad de brindarle a la planta nutrientes y factores protectores que aseguran su supervivencia (8). Debido a lo anterior, las bacterias para el estudio se eligieron en base a la capacidad de solubilización del fósforo y a la fijación de nitrógeno, la presencia de estos nutrientes es importante ya que, sin estos, su crecimiento se ve seriamente afectado, por esto muchos microorganismos en el suelo presentan mecanismos bioquímicos que transforman estos nutrientes asimilables para que los organismos vegetales puedan aprovecharlos. Autores como Wilvis, demostraron la capacidad de microorganismos psicrófilos aisladas de ecosistemas montañosos venezolanos para solubilizar fosfato inorgánico (26), Hernández (37), Montejo (38) y Kumar (41) muestran crecimiento en las diferentes plantas de sus ensayos y otorgan sus buenos resultados a usar microorganismos capaces metabolizar sustratos presentes en el suelo como lo es el nitrógeno y el fósforo.

Los resultados recolectados en este estudio también muestran de manera general el impacto negativo que tienen los factores ambientales como las bajas temperaturas sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas aromáticas, esto debido a las heladas, ya que el descenso de la temperatura es un punto crítico para los tejidos vegetales lo que genera daños por la congelación de la savia, provocando el marchitamiento de la planta y su muerte, generando así pérdidas para el agricultor (51). La vitalidad, la altura del tallo y el tamaño de las hojas son variables para analizar ya que permiten evaluar el desarrollo de la planta.

En los resultados, los ensayos con los microorganismos en las plántulas de menta y albahaca se vieron severamente afectadas comparados con el control que estaba en condiciones protegidas. Es el caso de las plántulas de menta que mostraron un deterioro evidente, pues sus hojas y tallo se tornaron de una tonalidad morada y al cabo de unas

semanas comenzaron a perder progresivamente sus hojas en algunas ocasiones, terminando solo con el tallo. Tal y como describe Valero en su revisión (52), en donde evidencia estos mismos síntomas. En el caso de las plántulas de albahaca, se observó que, aunque también disminuyó su crecimiento, no fue tan drástico comparado con las de menta, e incluso mostraron que pasaron a la fase reproductiva porque hubo la aparición de flores.

Con relación a la medición de raíces, en los dos ensayos, con menta y albahaca, se verificó un aumento en la longitud radicular. Esto podría indicar que éstas cepas bacterianas guardan un potencial como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y, si se compara con los ensayos en aromáticas como los realizados por Yarzabal y su equipo de trabajo, en donde evidencian en sus investigaciones un crecimiento radicular experimentando también con bacterias como *Pseudomonas* spp de suelos antárticos sobre la germinación de plantas de trigo, tanto in vitro como in vivo, cuyos resultados demostraron que *Pseudomonas* spp y otros organismos psicrófilos son metabólicamente activos ya que son capaces de solubilizar fácilmente los fosfatos inorgánicos del suelo, debido a esto promueve un crecimiento de las raíces inoculadas (26,43,44).

Los experimentos del presente proyecto se iban a realizar bajo condiciones de invernadero, pero debido a la pandemia generada por COVID-19, se tomó la determinación de trasladar a un espacio a cielo abierto en una azotea y las lecturas se llevaron a cabo en un lapso de tiempo mucho más corto. Sin embargo, las condiciones climáticas de los meses de diciembre y enero que se caracterizan por ser las más drásticas del año en la sabana de Bogotá, permitieron tener unos resultados similares a los esperados en cuanto al daño que podían sufrir las plantas aromáticas en estudio. Posiblemente, si los ensayos se hubiesen realizado bajo condiciones de invernadero, la protección del plástico y ambiente de humedad que genera un invernadero hubiera sido favorable para la interacción planta-microorganismo, pero no hubiera sido la real que tiene el agricultor en condiciones de campo abierto.

Aun con todos los inconvenientes, se obtuvieron resultados que brindan información importante sobre la capacidad promotora de estas bacterias, con las cuales se pueden establecer guías y procedimientos a mejorar para un posterior ensayo.

Se sugiere observar la actividad bacteriana promotora de crecimiento en semillas in vivo e in vitro al igual que previos estudios analizados y controlar variables como la temperatura y esterilización de la tierra ya que pueden generar alteraciones para futuros experimentos.

Si se logran esclarecer y entender todas estas posibles utilidades bacterianas como promotoras de crecimiento en condiciones de clima frío, tendría un gran impacto en la economía de los campesinos y, además, sería una solución innovadora para alimentar a la raza humana que día a día va aumentando su población.

6 CONCLUSIONES

- Los microorganismos de la Antártida utilizados en el ensayo demostraron funcionalidades relacionadas con la fijación del nitrógeno y solubilización de fosfatos, procesos esenciales para el desarrollo y crecimiento vegetal.
- En los bioensayos, se logró demostrar que las bacterias psicrófilas actuaron como promotores de crecimiento en las plantas de albahaca debido a que lograron llegar a la fase reproductiva en varios casos. Sin embargo, en los ensayos con menta, no se evidenció un efecto protector o de participación por parte de las bacterias porque las plántulas frenaron su crecimiento y se marchitaron.
- Los bioensayos permitieron identificar variables que pueden ser implementadas en futuros ensayos como, por ejemplo: un control más drástico en las temperaturas, realizar el ensayo en otra época del año en las mismas condiciones, e incluso esterilizar el suelo para evitar la intervención de otros microorganismos que pueden afectar las acciones de los microorganismos que se quieren probar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rojas PB. Hierbas aromáticas culinarias para exportación en fresco manejo agronómico, producción y costos [Internet]. 2004. p. 13. Available from: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/14068?show=full>
2. Amad M- Cultivos De Más Alto Valor En Colombia. 2006. Available from: https://www.unodc.org/pdf/andean/Colombia_coca_survey_2005_es.pdf
3. Diaz Merchán J. Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas. 2003. Available from: <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/32544>
4. Cardona JO, Barrientos JC. Producción, uso y comercialización de especies aromáticas en la región Sumapaz, Cundinamarca. Rev Colombia Ciencias Hortícolas. 2012. Available from: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1258
5. Restrepo JJA. Plantas aromáticas y medicinales Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. Medidas para la Tempor invernala. 2011. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/2c392587-f422-4ff5-a86f-d80352f0aa11/Plantas-aromaticas-y-medicinales-Enfermedades-de.aspx>
6. Fernández V. Fichas de cultivo de especies aromáticas tradicionales. Estud en Domest y cyltivo especies Med y aromáticas. 2012. Available from: <http://www.aiinfo.inia.uy/digital/bitstream/item/8778/1/Fpta-11-p.205-225.pdf>
7. Mateus-Perez LM, Vanegas-Forero Z. Caracterización de la Agrocadena de la Albahaca (*Ocimum basilicum*) en San Antonio Del Tequendama – Cundinamarca, Bajo el Enfoque del Desarrollo Territorial. Repositorio Universidad Distrital. 2015. Available from: <https://repository.udistrital.edu.co/handle/11349/3919>
8. Beltrán Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu. 2015. Available from: <http://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/401>

9. Helgason BL, Korschuh HJ, Bedard-Haughn A, VandenBygaart AJ. Microbial distribution in an eroded landscape: Buried A horizons support abundant and unique communities. *Agric Ecosyst Environ.* 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2014.06.029>
10. Pandey A, Yarzabal LA. Bioprospecting cold-adapted plant growth promoting microorganisms from mountain environments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30465306/>
11. Douglas M. Bacteria of ice and snow in Antarctica. 1918; Available from: <https://www.nature.com/articles/102035a0>
12. García-López E, Alcázar P, Postigo M, Cid C. The effect of climate change on microbial communities from glaciers. *Glaciers Form Clim Chang their Eff.* 2016. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2018.00512/full>
13. Descalzo LG. Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica *Shewanella frigidimarina*. 2014; Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=99480>
14. Bartha R. Ecología microbiana y Microbiología ambiental [Internet]. 2002. Available from: https://www.ingebook.com/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187&codigo_libro=4649
15. Michael M, Martinko J, Bender K, Buckley D, Stahl D. *Biología de los microorganismos*. 2015. Available from: https://www.ingebook.com/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187&codigo_libro=4649
16. Borges N, Ramos A, Raven NDH, Sharp RJ, Santos H. Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes from extremophiles. 2002. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12072956/>

17. Horn G, Hofweber R, Kremer W, Kalbitzer HR. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17437059/>
18. Ramírez D. N, Serrano R. JA, Sandoval T. H. Actinomicetos halófilos en México. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2006. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>
19. Sarmiento F, Peralta R, Blamey JM. Cold and hot extremozymes: Industrial relevance and current trends. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2015.00148/full>
20. Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, Omar SM, Siddiqui KS, Williams TJ. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microb Biotechnology*. 2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21733127/>
21. Huston AL. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes. *Psychrophiles From Biodivers to Biotechnology*. 2008. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74335-4_20
22. Margesin R. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology: Second Edition*. *Psychrophiles From Biodivers to Biotechnology*. 2017. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-74335-4>
23. Fornbacke M, Clarsund M. Cold-Adapted Proteases as an Emerging Class of Therapeutics. 2013. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40121-013-0002-x>
24. Belmar AR, Alfonso V. Microorganismos extremófilos. Psicrófilos y sus mecanismos de adaptación. 2018. Available from: <https://docplayer.es/207926100-Microorganismos-extremofilos-psicrofilos-y-sus-mecanismos-de-adaptacion.html>
25. FAO. El daño producido por las heladas: Fisiología y Temperaturas críticas. *Protección contra las heladas*. 2010. Available from: <http://www.fao.org/docrep/012/y7223s/y7223s00.html>
26. Balcazar W, Rondón J, Rengifo M, Ball MM, Melfo A, Gómez W, et al. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.001>

27. Oliart-Ros R, Manresa-Presas Á, Sánchez-Otero M. Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development. 2016. Available from: <https://www.proquest.com/openview/274d2afb128f007410483d687cbeb8c2/1?pqorigsite=gscholar&cbl=2069501>
28. Rondón JJ, Ball MM, Castro LT, Yarzabal LA. Eurypsychrophilic *Pseudomonas* spp. isolated from Venezuelan tropical glaciers as promoters of wheat growth and biocontrol agents of plant pathogens at low temperatures. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00072-2>
29. Yadav AN, Sachan SG, Verma P, Saxena AK. Prospecting cold deserts of north western Himalayas for microbial diversity and plant growth promoting attributes. 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.11.006>
30. Tapia-Vázquez I, Sánchez-Cruz R, Arroyo-Domínguez M, Lira-Ruan V, Sánchez-Reyes A, del Rayo Sánchez-Carbente M, et al. Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico. 2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31865222/>
31. Al-Ghanayem AA, Joseph B. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. 2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32037467/>
32. Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. 1998. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/116/2/447/6085629>
33. Massaccesi L, Benucci GMN, Gigliotti G, Cocco S, Corti G, Agnelli A. Rhizosphere effect of three plant species of environment under periglacial conditions 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.010>
34. Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. 2008. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/148/3/1547/6107595>

35. Aviles M, Flores I, Hernández C, Santoyo G, Valencia E. La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. 2016. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta/resource/pt/biblio-1041771>
36. Li M, Guo R, Yu F, Chen X, Zhao H, Li H, et al. Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *arthrobacter pascens* zz21. 2018. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29389906/>
37. Hernández C, Ruíz LF, Valencia E. Endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulate achene germination, in vitro growth, and greenhouse yield of strawberry (*Fragaria × ananassa*). 2020. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030442381930891X>
38. Montejó W, Valencia E, López P, Velázquez C. Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 sobre la germinación y crecimiento de *Pinus devoniana* Lindley. *Polibotánica*. 2016. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682016000100079
39. Fernández AJ, Martínez P, Cobo J, Villadas PJ, Martínez E, Toro N, et al. The rhizosphere microbiome of burned holm-oak: Potential role of the genus *Arthrobacter* in the recovery of burned soils. 2017. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-06112-3>
40. Naqqash T, Imran A, Hameed S, Shahid M, Majeed A, Iqbal J, et al. First report of diazotrophic *Brevundimonas* spp. as growth enhancer and root colonizer of potato. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69782-6>
41. Kumar V, Gera R. Isolation of a multi-trait plant growth promoting *Brevundimonas* sp. and its effect on the growth of Bt-cotton. 2014. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69782-6>
42. Hernández A, Rives N, Acebo Y. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae*

- (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L). 2014. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100001
43. Yarzabal LA, Monserrate L, Buela L, Chica E. Antarctic *Pseudomonas* spp. promote wheat germination and growth at low temperatures. 2018. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2374-6>
44. Yarzabal LA. Perspectives for using glacial and periglacial microorganisms for plant growth promotion at low temperatures. 2018. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10468-4>
45. Roig Mesa JT. Plantas medicinales y aromáticas. *Rev Cuba farm.* 1968. Available https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/plantas_medicinales.pdf
46. Urriaga ML. Plantas aromáticas para huertos urbanos. 2014. Available from: https://www.ciaorganico.net/documypublic/366_Aromaticas_y_su_rol_en_la_huerta.pdf
47. Lastra H, Piquet R. Artículos de Revisión *CALENDULA OFFICINALIS*. 1999. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v33n3/far07399.pdf>
48. Orellana J. EFECTO DE VARIAS DOSIS DE FERTILIZANTE NITROGENADO EN EL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DEL CULTIVO DE HIERBABUENA (*Mentha sativa* L) EN LA PARROQUIA CONE PROVINCIA DEL GUAYAS. 2013. Available from: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/2630>
49. Castro D, Diaz J, Serna R. Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. 2013. Available from: <https://www.uco.edu.co/investigacionuco/fondoeditorial/catalogo/libroplantasaromaticas2013.pdf>
50. Huerto U. El romero y más plantas medicinales. 2012. Available from: <http://www.elhuertourbano.net/aromaticas/el-romero/>
51. CAR. Informe del registro e impactos de heladas en el territorio car. 2020. Available from: <https://www.car.gov.co/uploads/files/5e543336c829c.pdf>.
52. Valero Urbina. Daños por heladas en frutales. 2015. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/70290173.pdf>

53. Mazoni M. ESTUDIO Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN LECHE DE CABRA.2003 Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25406/1/MazoniMaría.pdf>
- 54 Guerrero L, Román S, Pacheco L. Proteolysis During Cold Storage of Refrigerated Raw Milk. Effect of Proteolytic Enzymes on Casein Integrity.2003. Available from: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14977>
- 55 Sánchez E, Heredia J, Buitrago S, Medina J. Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. 2020. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v22n1/0123-3475-biote-22-01-36.pdf>
- 56 Saavedra S. Manual de preparación de medios de cultivo. 2017. Available from: https://issuu.com/sandralucia.71/docs/manual_preparacion_de_medios_de_cul#:~:text=AGAR%20ALMIDON%20FUNDAMENTO%3A%20Medio%20de,claro%20alrededor%20de%20la%20colonia.
- 57 Ávila E, Lizarazo L, Cortés F. Growth Promotion of Baccharis macrantha (Asteraceae) by Phosphate Solubilizing Rhizosphere Bacteria. 2014. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v20n3/v20n3a10.pdf>
- 58 Corrales L, Sánchez L, Arévalo Z, Moreno V. Bacillus: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. 2015. Available from: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/download/276/529>
- 59 Lemus J. Multiplicación en Medio Líquido de Microorganismos del Género Streptomyces Aislados de un Nicho Ecológico del Campus Belmonte de la Universidad Libre Seccional Pereira. 2016. Available from: <http://media.utp.edu.co/vicerrectoria-de-investigaciones/archivos/PONENCIA%20-%20MULTIPLICACION%20EN%20MEDIO%20LIQUIDO.pdf>
- 60 Duque J, López R. Evaluación preliminar para aislamiento e identificación bioquímica de Streptomyces sp., a partir de un nicho ecológico del Campus Belmonte de la

Universidad Libre, Seccional Pereira. 2015. Available from:
<https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/17609/EVALUACIÒN%20PRELIMINAR%20PARA%20AISLAMIENTO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

61 Valderrama L. Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp). Available from:
<https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/handle/10893/10176/7720-0446202.pdf?sequence=1>

62 Villegas M, Prado I, Ortega M. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* using the Most Probable Number method. 2012. Available from:
<https://www.redalyc.org/pdf/2031/203124632011.pdf>