



***CARACTERIZACIÓN DE FACTORES PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL
DE *Pseudomonas* PSICRÓFILAS Y SU EFECTO EN LA PROMOCIÓN DE
CRECIMIENTO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*)***

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



***CARACTERIZACIÓN DE FACTORES PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL
DE Pseudomonas PSICRÓFILAS Y SU EFECTO EN LA PROMOCIÓN DE
CRECIMIENTO EN TOMATE (Solanum lycopersicum)***

ANGIE MELISSA OROBIO LÓPEZ
JULIANA PAOLA ROZO ARCHILA

ASESORA INTERNA
JOVANNA ACERO GODOY, MSC.

ASESORA EXTERNA
LAURA INÉS CUERVO SOTO, MSC.PHD

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



AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a Dios por permitirme culminar mis estudios y por permitirnos realizar nuestro proyecto de grado, a mis padres y hermana por su apoyo durante este proceso, a mi amiga Juliana por haber sido un gran equipo, a la profesora Laura por habernos dado la oportunidad de trabajar con ella, a la profesora Jovanna por direccionarnos, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por haberme admitido y formado como una profesional íntegra y por último, a la Universidad Antonio Nariño por habernos permitido realizar nuestro trabajo de grado.

Angie Melissa Orobio López

Quiero agradecer a Dios por siempre bendecirme y acompañarme durante todos mis estudios y permitirnos culminar nuestro trabajo de grado, a mi familia por estar en todo momento acompañándome, apoyándome y dándome fuerza durante todo el transcurso de este proceso, a mi amiga Angie por ser una excelente compañera, por haberme apoyado y ayudado en todo momento e igualmente a todos nuestros amigos que nos apoyaron, a nuestras asesoras por darnos la oportunidad de trabajar con ellas, por apoyarnos y ayudarnos en nuestros momentos de dudas, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por acogerme y formarme como una excelente profesional y por último a la Universidad Antonio Nariño por darnos la oportunidad de realizar nuestro trabajo de grado en sus instalaciones.

Juliana Paola Rozo Archila



TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. Antecedentes	14
2. Marco referencial	15
2.1 Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	15
2.2 Origen del tomate	16
2.3 Producción mundial del cultivo de tomate	17
2.4 Producción de tomate en Colombia	17
2.5 Valor nutricional del tomate	18
2.6 Nutrientes necesarios para las plantas	18
2.7 Enfermedades del tomate	19
2.8 Uso de fertilizantes	20
2.9 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal	21
2.10 Generalidades de <i>Pseudomonas spp.</i>	21
2.11 Microorganismos extremófilos	22
2.12 Microorganismos psicrófilos	22
2.13 Factores reguladores del crecimiento vegetal	23
2.13.1 Producción de auxinas	23
2.13.2 Solubilización de fosfato	24
2.13.3 Fijación de nitrógeno	24
2.13.4 Catalasa	25
2.13.5 Motilidad	25
3. Diseño metodológico	26
3.1 Universo, población y muestra	26



3.2 Hipótesis, variables e indicadores	27
3.3 Técnicas y procedimientos	27
3.3.1 Conservación, adaptación y recuperación de las <i>Pseudomonas</i> psicrófilas	27
3.3.2 Determinación de factores promotores de crecimiento vegetal	27
3.3.3 Promoción de crecimiento de tomate por <i>Pseudomonas spp.</i> psicrófilas	30
3.3.4 Amplificación del gen 16S.....	31
4. Resultados	32
4.1 Determinación de factores promotores de crecimiento vegetal en <i>Pseudomonas</i> psicrófilas.....	32
4.1.1 Producción de auxinas	32
4.1.2 Solubilización de fosfatos	33
4.1.3 Fijación de nitrógeno	34
4.1.4 Producción de amonio	35
4.1.5 Catalasa	35
4.1.6 Motilidad	36
4.2 Porcentaje de germinación plantas de tomate	37
4.3 Evaluación de promoción de crecimiento	38
4.4 Amplificación del gen 16S	42
5. Discusión.....	43
6. Conclusiones	48
7. Recomendaciones	49
8. Referencias bibliográficas	50
9. Anexos	54



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Rutas metabólicas del ácido indolacético	24
Figura 2. Determinación cualitativa de AIA.....	32
Figura 3. Prueba cualitativa de solubilización de fosfatos	33
Figura 4. Prueba de fijación de nitrógeno	34
Figura 5. Prueba de catalasa	35
Figura 6. Prueba de motilidad	36
Figura 7. Germinación plántulas de tomate durante 15 días	37
Figura 8. Peso fresco y seco de la raíz de las plantas de tomate	39
Figura 9. Peso fresco y seco del tallo de las plantas de tomate	40
Figura 10. Longitud del tallo de las plantas de tomate	40
Figura 11. Longitud de la raíz de las plantas de tomate	41
Figura 12. Longitud total de las plantas de tomate.....	41
Figura 13. Número de hojas de la planta de tomate.....	42
Figura 14. Electroforesis del gen 16S.....	43



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Producción mundial de tomate en el año 2017	17
Tabla 2. Principales enfermedades que afectan el cultivo de tomate	19
Tabla 3. Concentraciones de producción de AIA por <i>Pseudomonas</i> psicrófilas	33
Tabla 4. Concentraciones de fosfato soluble por las <i>Pseudomonas</i> psicrófilas	34
Tabla 5. Concentraciones de producción de amonio por <i>Pseudomonas</i> psicrófilas	35
Tabla 6. Resultado de pruebas cualitativas de factores promotores de crecimiento por las <i>Pseudomonas</i> psicrófilas	36
Tabla 7. Resultado de pruebas cuantitativas de factores promotores de crecimiento por las <i>Pseudomonas</i> psicrófilas	37
Tabla 8. Porcentaje de germinación de plántulas de tomate, estimuladas con <i>Pseudomonas</i> psicrófilas y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO)	38



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**CARACTERIZACIÓN DE FACTORES PROMOTORES DE CRECIMIENTO
VEGETAL DE *Pseudomonas* PSICRÓFILAS Y SU EFECTO EN LA PROMOCIÓN
DE CRECIMIENTO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza que posee gran importancia en cuanto a su valor nutricional y económico. Para una cosecha más productiva se utilizan fertilizantes, generalmente químicos, estos brindan nutrientes adicionales al suelo para que las plantas los asimilen e incrementen su desarrollo; sin embargo, su uso indiscriminado genera daños a los ecosistemas. Para minimizar su uso, existen alternativas biológicas como el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPM), que promueven el crecimiento de plantas por medio de diferentes mecanismos como la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y ácidos orgánicos; dichas características de los bioinsumos agrícolas constituyen una alternativa para una agricultura sostenible y amigable con el medio ambiente.

En esta investigación, se evaluó la capacidad de 3 cepas de *Pseudomonas* psicrófilas (2.1, 2.2 y 2.3) para promover el crecimiento en tomate, mediante la caracterización de factores promotores de crecimiento vegetal. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa 2.2 y 2.3



tuvieron una concentración de fosfato soluble de 199,6 mg/l y 118 mg/l respectivamente, fijación de nitrógeno atmosférico donde la única cepa que tuvo esta capacidad fue la 2.2, producción de ácido indolacético con valores de 574.4, 424.9 y 233.7 $\mu\text{g/ml}$, para las cepas 2.1, 2.2, 2.3 respectivamente, producción de amonio en que la cepa 2.2 fue la que produjo mayor concentración con 0.21 mg/l, y catalasa y motilidad donde se evidencio que todas las cepas producen la enzima y tienen la capacidad de movilizarse. La identidad de las bacterias fue confirmada con la amplificación del gen 16S rRNA.

Palabras clave: *Tomate, PGPM, Pseudomonas spp., factores promotores de crecimiento vegetal, AIA, fosfatos, producción de amonio, fijación de nitrógeno, catalasa, motilidad.*

ANGIE MELISSA OROBIO LÓPEZ, JULIANA PAOLA ROZO ARCHILA
Estudiantes

JOVANNA ACERO GODOY, MSC.
Asesora interna, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

LAURA INÉS CUERVO SOTO, MSC.PHD
Asesora externa, Universidad Antonio Nariño

Septiembre de 2019



INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza originaria de Sudamérica que actualmente es distribuida y cosechada a nivel mundial. Colombia ocupa el puesto 32 en producción mundial de tomate, este es un cultivo de consumo interno y de amplio uso en la gastronomía, lo cual implica una problemática, pues, su alta demanda casi que obliga a ser producido con agroquímicos, una de las actividades que desarrollan los agricultores para obtener mayores rendimientos; sin embargo, su uso indiscriminado acarrea consecuencias perturbando el suelo en su capacidad de retención de agua, fertilidad, salinidad y concentración de nutrientes, entre otros¹.



Además, el cambio climático es un factor que afecta la agricultura, por lo que los cultivos son extremadamente vulnerables, pues, en los últimos años los periodos de lluvia se han prolongado e intensificado su magnitud lo cual afecta directamente el cultivo de tomate, ya que su temperatura óptima de crecimiento está entre los 20°C y 25°C, lo anterior provoca reducción en el rendimiento de las cosechas e incluso pueden llegar a fracasar generando pérdidas económicas.

Dentro de las buenas prácticas agrícolas (BPA), para el desarrollo de una agricultura sostenible, que permite reducir los impactos ocasionados por los métodos de fertilización convencional, que no degraden la capacidad productiva de los suelos, que sea de bajo costo, regenerador de biomasa y protectores del medio ambiente, se constituye como alternativa el uso de biofertilizantes. Dichos biofertilizantes están constituidos por bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPM) que tienen la capacidad de impactar en cuatro vías: mejorando el crecimiento y la productividad de la planta por la presencia de factores de promoción de crecimiento vegetal², actuando contra microorganismos patógenos para disminuir las enfermedades en el mismo, reduciendo los costos de producción al reemplazar los fertilizantes químicos y por último, protegiendo el suelo y ambiente.

Al tener en cuenta que el uso de biofertilizantes es una alternativa, se sabe que los biofertilizantes comerciales por lo general son microorganismos mesófilos, donde dichos microorganismos no tienen la capacidad de crecer óptimamente en condiciones de estrés o extremas, por ello, en esta investigación se estudiaron bacterias psicrófilas que tienen la capacidad de crecer óptimamente en ambientes fríos, una posible solución a una de las problemáticas planteadas.

Las PGPM tienen la capacidad de colonizar el sistema radicular o el entorno más cercano, se pueden clasificar en simbióticas que colonizan el tejido de la planta formando nódulos, endófitas que se hospedan en las estructuras internas, y bacterias de vida libre que se encuentran cerca al sistema radicular de la planta. Entre las PGPM más referenciadas se encuentran los géneros: *Pseudomonas sp.*, *Azospirillum sp.*, *Rhizobium sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Azotobacter sp.*, *Erwinia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Xanthomonas sp.* y



Enterobacter sp. En esta investigación se tuvo como objetivo evaluar cualitativa y cuantitativamente factores promotores de crecimiento vegetal en *Pseudomonas* psicrófilas, y evaluar su efecto de germinación en la promoción de crecimiento de tomate (*Solanum lycopersicum*), es de gran interés conocer la potencialidad como promotores de crecimiento vegetal en *Pseudomonas* psicrófilas, ya que frente al estrés abiótico que sufren los cultivos es importante encontrar una nueva alternativa de microorganismos que estén adaptados a condiciones extremas como la temperatura, pudiendo ser utilizados en zonas agrícolas donde el clima es más frío.

Las metodologías utilizadas para evaluar los factores promotores de crecimiento fueron: la metodología propuesta por Glickman y Dessaux (1995) para determinación de ácido indolacético (AIA), metodología propuesta por Sundara Rao y Sinha (1963) para determinación de solubilización de fosfatos, la metodología propuesta por Medhin H. Kifle and Mark D. Laing (2016) para la prueba de fijación de nitrógeno, la metodología propuesta por Ahmad et al. (2008) para evaluar la producción de amonio, la prueba en portaobjeto para evaluar la presencia de la enzima catalasa y el protocolo de Boyer (2008) para la prueba de motilidad; en cuanto a las pruebas cuantitativas, se realizaron procedimiento similares en caldos y se determinó la concentración del factor promotor mediante espectrofotometría y fotometría. La metodología usada para evaluar la promoción de crecimiento en plantas de tomate fue en primer paso ajustar los inóculos de cada cepa a una densidad óptica de 0.160, en dicho inóculo las semillas de tomate chonto estuvieron en contacto durante 2.0 horas en agitación a 100.0 rpm, cada semilla fue sembrada en los pozos de los germinadores con turba, y a los 15.0 días posterior a la siembra fueron trasvasadas las plantas que germinaron a pozos más grandes, pasados 45.0 días luego de haber sido trasvasadas se midieron las variables de peso seco y fresco del tallo, raíz y planta, longitud de la raíz, tallo y planta y número de hojas. Por último se amplificó el gen 16S con el siguiente protocolo: En un eppendorf se agrego 2,5 μ l de buffer, 1,25 μ l de $MgCl_2$, 0,5 μ l de dNTPs, 0,06 μ l del primer Fw, 0,06 μ l del primer Rv, 0,2 μ l de Taq DNA polimerasa (invitrogen), 19,43 μ l de agua destilada estéril y 1.0 μ l de DNA genómico de una cepa, para obtener un volumen final de 25.0 μ l. Se dispuso a



introducir cada eppendorf en el equipo PCR termociclador y se determinó el protocolo ya preestablecido de los ciclos para la amplificación.

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa 2.2 y 2.3 tuvieron una concentración de fosfato soluble de 199,6 mg/l y 118 mg/l respectivamente, fijación de nitrógeno atmosférico donde la única cepa que tuvo esta capacidad fue la 2.2, producción de ácido indolacético con valores de 574.4, 424.9 y 233.7 $\mu\text{g/ml}$, para las cepas 2.1, 2.2, 2.3 respectivamente, producción de amonio en que la cepa 2.2 fue la que produjo mayor concentración con 0.21 mg/l, y catalasa y motilidad donde se evidencio que todas las cepas producen la enzima y tienen la capacidad de moverse.

Se concluye que son pocos los estudios de promoción de crecimiento vegetal que se han realizado en bacterias psicrófilas, siendo este proyecto un promotor de la innovación con el empleo de microorganismos extremófilos como biofertilizantes, teniendo en cuenta que son una alternativa que impacta a nivel medioambiental y económico, que disminuye el uso de agentes químicos que generan compuestos tóxicos. Se resalta en dicha investigación que la cepa 2.2 fue la que produjo mayor porcentaje de germinación y también demostró *in vitro* la presencia de la mayoría de factores promotores de crecimiento vegetal.



Objetivos

Objetivo General

Caracterizar factores promotores de crecimiento vegetal en *Pseudomonas psicrófilas* y evaluar su efecto en la promoción de crecimiento de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Objetivos Específicos

- Caracterizar cualitativamente y cuantitativamente factores promotores de crecimiento vegetal en *Pseudomonas spp.* psicrófilas.
- Evaluar efecto de *Pseudomonas* psicrófilas sobre la germinación de semillas de tomate.
- Evaluar el efecto de *Pseudomonas* psicrófilas sobre el crecimiento de tomate.



1. Antecedentes

La capacidad de promoción de crecimiento vegetal por muchas bacterias y hongos ha sido ampliamente estudiada. a continuación se mencionan algunos de estos reportes, que son importantes referentes para la investigación. Parani y Saha en el 2012, determinaron la acción biofertilizante y control biológico de cepas de *P. fluorescens* (K-34, 1773/K y BIHB745). Las cepas evaluadas produjeron sideróforos, y solubilizaron fosfatos, a través de la producción de ácidos orgánicos y descenso de pH del medio (7 a pH 4). El valor de fosfato soluble estuvo sobre los 900 mg/l para todas las cepas y también fueron productoras de ácido indol acético (AIA), cuyos valores fueron 3,2, 3,5 y 4,7 $\mu\text{Mol/ml}$ para la cepa 1773/K, BIHB745 y K-34 respectivamente³.

Goswami et al. en 2012, aislaron una cepa de *Pseudomonas* spp. psicrófila de aguas marinas y determinaron la producción de ácido indolacético (29 $\mu\text{g/ml}$), solubilización de fosfato (34 $\mu\text{g/ml}$), producción de amonio con reactivo de Nessler (32 $\mu\text{g/ml}$) y catalasa positivo, además, evaluaron la promoción de crecimiento vegetal *in vivo* en plantas de garbanzo donde mostraron una actividad de crecimiento significativo⁴.

Sánchez et al. en 2012, evaluaron el efecto de varias cepas (entre ellas *Pseudomonas putida* PSO14 y *Pseudomonas fluorescens* PSO13) en la promoción de crecimiento vegetal sobre cultivos de tomate. Además, identificaron *in vitro* la capacidad de las cepas de solubilizar fósforo de roca fosfórica, y después de 24 horas de incubación observaron valores de 2.08 mg/l por la cepa PSO14; también produjeron indoles totales, la cepa PSO13 (24.29 $\mu\text{g/ml}$), y PSO14 (22.14 $\mu\text{g/ml}$). En el experimento en invernadero determinaron diferentes variables, entre ellas la longitud de la planta y la longitud radicular donde ambas cepas demostraron un comportamiento efectivo en la promoción de crecimiento vegetal de los cultivos de tomate⁵.



Kifle y Laing en 2016 aislaron bacterias diazotróficas de vida libre asociadas a la rizósfera del maíz, e identificaron cepas de *Pseudomonas nitroreducens*, lo cual estaría demostrando la capacidad de estas bacterias de fijar nitrógeno atmosférico, prueba que fue realizada en medio semisólido libre de nitrógeno, y determinada la actividad con reactivo Nessler⁶.

Meliani et al. en 2017 estudiaron algunos factores promotores de crecimiento en cepas de *P. putida* y *P. fluorescens*, demostraron que producen sideróforos y producen AIA, en la que se obtuvo que *P. putida* y *P. fluorescens* tenían la capacidad de sintetizar dicha fitohormona con una producción de 166 µg/ml y 89 µg/ml respectivamente, además, se evidenció que hubo un mejoramiento significativo en plantas de lenteja tratadas con las cepas anteriormente mencionadas⁷.

Suyal et al, en 2017, evaluaron la respuesta fisiológica de *Pseudomonas jessenii* a bajas temperaturas y bajo condiciones en ausencia de nitrógeno, ya que las bacterias generan respuestas adaptativas para la supervivencia. En medio Burk que es deficiente en nitrógeno observaron crecimiento exuberante de *P. jessenii*, y además, se amplificó el gen *nif*, que a menudo se usa como biomarcador para identificar microorganismos diazótrosos⁸.

Pseudomonas spp. OFT2 y OFT5, productoras de ACC desaminasa, fueron analizadas por Win et al. 2018 para promoción de crecimiento de tomate. Los resultados demuestran que ambas cepas promovieron el crecimiento de tomate, y la cepa OFT5 tuvo mayor influencia en el estatus fisiológico de la planta y el balance iónico frente a OFT2⁹.

2. Marco referencial

2.1 Tomate (*Solanum lycopersicum*)

TAXONOMÍA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae



Género: *Solanum*

Subgénero: *Potatoe*

Especie: *Solanum lycopersicum*¹⁰.

El tomate es una hortaliza que pertenece al género *Solanum* y a la familia de las solanáceas, es originario de Sudamérica pero su domesticación procede de dos lugares: la parte noroccidental de Sudamérica en las zonas montañosas de Perú y Ecuador, y en Centro América en el imperio azteca, Tenochtitlan, lugar donde los conquistadores españoles conocieron dicha hortaliza y la introdujeron a Europa. Desde ahí el tomate se comenzó a cultivar en los jardines de Europa como planta ornamental, pues inicialmente se creía que era venenosa por pertenecer a la familia de las solanáceas. En la actualidad, su cultivo se ha extendido mundialmente puesto que su fruto es comestible, este se destina principalmente en su estado fresco para el consumo, además sirve como materia prima para elaborar diversos derivados, como pastas, sopas y deshidratados¹¹.

Esta hortaliza crece adecuadamente en climas cálidos y es susceptible a temperaturas bajas, crece entre los 20 y 25°C a temperaturas diurnas, y nocturnas a 15 y 20°C; bajo invernadero la fructificación se da entre los 8 y 12°C, si la temperatura es inferior podría generar debilitamiento y decadencia progresiva a la planta, y si se excede a los 32°C se altera la fisiología y se estimulan los procesos bioquímicos provocando un agotamiento a la planta. El tomate tiene un crecimiento rápido, la germinación está dada entre el cuarto y séptimo día posterior a la siembra, teniendo una floración entre los 20 a 40 días después del trasplante y la maduración del cultivo entre 80 a 120 días posterior al trasplante¹².

La característica de la raíz depende del sistema de siembra, cuando se siembra de forma directa presenta un sistema radicular profundo para poder anclarse al suelo y poco ramificado, y cuando es trasplantada de un semillero, las raíces son superficiales y muy ramificadas¹³. De la raíz, se origina el tallo principal que tiene un diámetro de 2-4 cms, sobre éste se desarrollan las hojas y el tallo secundario; las hojas se disponen alternativamente sobre el tallo y presentan bordes dentados recubiertas de vellosidades. Posee flores hermafroditas que se agrupan en racimos entre tres a diez sépalos dependiendo de la variedad, estas presentan pétalos de color amarillo, con forma helicoidal y normalmente



tienen un tamaño pequeño¹⁴. El fruto está constituido por la cáscara o piel, pulpa y semillas; es una baya redonda de color llamativo que presenta tonos entre amarillos y rojos como signo de maduración organoléptica; esto es debido a la presencia de pigmentos que le dan su color característico tales como el caroteno y el licopeno, la mayoría de los frutos son redondos, su tamaño varía oscila entre los 3 y 10 cm y un peso entre 80 y 300 gr¹¹.

2.2 Origen del tomate

El término genérico proviene del náhuatl *tomatl* que significa tomate, los primeros cronistas españoles del siglo XVI tradujeron el término españolizado de “tomate”. Su origen se encuentra en la región andina de Colombia, Chile, Perú y Bolivia¹¹; la especie *Lycopersicon esculentum* llegó a Mesoamérica como planta espontánea (*L. esculentum* var. *cerasiforme*) a través de medios naturales como los pájaros, sin la intervención del hombre¹⁵.

La primera referencia escrita sobre el cultivo de tomate en España fue publicada a fines del siglo XVI por Gregorio de los Ríos, un sacerdote que se dedicaba al cuidado del jardín botánico de Aranjuez; a pesar de que el tomate había llegado desde el siglo XVI, su consumo generalizado se produjo doscientos años más tarde, debido a la desconfianza de los consumidores y botánicos, ya que se consideraba solo una planta ornamental¹⁵.

2.3 Producción mundial del cultivo de tomate

El tomate posee una gran importancia económica y comercial mundialmente, su fruto es destinado para el consumo o como materia prima para sus derivados. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), cerca de 164 países producen alguna variedad de tomate, según reportes del 2017 procedentes de FAOSTAT, base de datos de la FAO, China es el principal productor mundial con 59,514,773 toneladas (t), le sigue India con 20,708,000 t, en tercer puesto está Turquía con 12,750,000 t, Estados Unidos ocupa la cuarta posición con 10,910,990 t y Egipto con 7,297,108 t¹⁶ (tabla 1).

Tabla 1. Producción mundial de tomate en el año 2017¹⁶.

País	Producción (ton)	Porcentaje
------	------------------	------------



China, Continental	59.514.773	32.6
India	20.708.000	11.4
Turquía	12.750.000	7.0
Estados Unidos de América	10.910.990	6.0
Egipto	7.297.108	4.0
Irán (República Islámica)	6.177.290	3.4
Italia	6.015.868	3.3
México	4.243.058	2.3
Brasil	4.230.150	2.3

2.4 Producción de tomate en Colombia

El tomate se cultiva en más de cien países a nivel mundial, Colombia ocupa el puesto N° 32¹¹, la última producción consolidada en Colombia fue de 632.268 toneladas, es la hortaliza que más se siembra en el país con 14.855 hectáreas y un rendimiento promedio de 28,1 toneladas por hectárea. Según la base de evaluaciones agrarias del Ministerio de Agricultura en 2017, Antioquia fue la región con mayor producción, con un registro de 156.421 toneladas, seguido por Norte de Santander con 86.017 t, Boyacá con 72.851 t, Cundinamarca con 70.631 y Santander con 65.948 t¹⁷. La alta demanda del tomate chonto en Colombia se debe al consumo directo, en la preparación de guisos y pastas, y en un menor porcentaje es destinado para uso industrial¹⁸. Se evidencia que la mayor parte de la producción es destinada para el consumo interno y no para la exportación, incluso, se tienen restricciones frente a la exportación del tomate debido a la presencia de la plaga *Tuta absoluta*, el gusano cogollero que en estado larvario se alimentan del tejido vegetal y va formando minas, y como consecuencia disminuye el rendimiento en producción del tomate y provoca pérdidas económicas directas al agricultor¹⁹.

2.5 Valor nutricional del tomate



El tomate es una importante fuente de vitaminas (B1, B2, B5, A y C) las cuales son necesarias para diferentes procesos celulares, contiene carotenoides como el licopeno, que junto a la vitamina C actúan como antioxidantes, con una función protectora para el organismo. Los principales minerales son el potasio, magnesio y fósforo y contiene gran porcentaje de agua, 93,5% por 100 g y 23 kcal, justo la proporción de energía requerida por el organismo para realizar las actividades diarias¹¹.

2.6 Nutrientes necesarios para las plantas

Los nutrientes se clasifican en dos categorías dependiendo de la cantidad que requiera la planta, se denominan macronutrientes cuando requieren grandes cantidades, estas deben ser aplicadas en el suelo si la cantidad es deficiente, en los nutrientes primarios o macronutrientes se incluye el nitrógeno, el fósforo y el potasio; y en los nutrientes secundarios o micronutrientes, que son tomados por la planta en cantidades mínimas se encuentra el hierro, el manganeso, el zinc, el cobre, el molibdeno, el cloro y el boro²⁰.

El nitrógeno está involucrado en el desarrollo de la planta, es absorbido en estado inorgánico como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), es uno de los constituyentes principales de los aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, pared celular y clorofila. A pesar de que es uno de los elementos más comunes en el planeta, no está disponible para las plantas, ya que su mayor parte se encuentra como nitrógeno molecular, estado en el cual las plantas no tienen la capacidad de asimilarlo directamente, por ello, es transferido mediante la acción simbiótica o asimbiótica de las bacterias, o disuelto en el agua de lluvia. La disponibilidad de nitrógeno está regulada por el equilibrio de los procesos biológicos, y consecuentemente por la temperatura y humedad del suelo²¹.

El fósforo es usualmente absorbido como ión ortofosfato primario, parte del fosfato inorgánico es almacenado en las raíces y otra es transportada a partes superiores; por medio de reacciones químicas se incorpora en compuestos orgánicos, y posteriormente, es útil en los procesos físico químicos e importante para la formación de los ácidos nucleicos. El fosfato forma parte de la estructura del ATP, por ello es indispensable en procesos que involucran



transferencia de energía, tal como el movimiento de los nutrientes y la fotosíntesis. Normalmente, este elemento es deficiente en los suelos²¹.

El potasio es absorbido por las plantas en forma de ión K⁺, es el catión más abundante presente en el citoplasma; funciona como activador de enzimas, vital en la síntesis de carbohidratos y proteínas, y mantiene la presión de turgencia de la célula, lo cual permite la elongación de la células y evita el marchitamiento prematuro de las hojas²¹.

4.7 Enfermedades del tomate

El cultivo de tomate puede ser afectado por plagas y enfermedades los cuales pueden perjudicar directamente la producción y la calidad del fruto, generando cuantiosas pérdidas económicas, algunas de las principales plagas y enfermedades se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2. Principales enfermedades que afectan el cultivo de tomate²².

	Enfermedad	Microorganismo causante
Bacterianas	Chancro bacteriano	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
	Peca bacteriana	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
	Necrosis de la médula o tallo hueco	<i>Pseudomonas corrugata</i>
	Marchitamiento bacteriano	<i>Pseudomonas solanacearum</i>



	Podredumbre blanda del tallo	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>
Fúngicas	Mal de los almácigos (Damping off)	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> , <i>Rizoctonia spp.</i> y <i>Pytium spp.</i>
	Moho gris	<i>Botrytis cinerea</i>
	Polvillo o cenicilla	<i>Oidium lycopersici</i> y <i>Oidium silicua</i>
	Moho de las hojas Fusariosis	<i>Fulvia fulva</i> o <i>Cladosporium fulvum</i>
	Tizón temprano	<i>Alternaria solani</i>
	Mancha gris del tomate	<i>Stemphylium solani</i>
	Marchitez por fusarium	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Virales	Begomovirus	<i>Especies de begomovirus</i>
	Hojas cordón de zapato	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
	Peste negra	<i>Groundnut ringspot virus</i> (GRSV), <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) y <i>Tomato chlorotic spot virus</i> (TCSV)

2.8 Uso de fertilizantes

Los fertilizantes son material de origen natural o industrial que contiene por lo menos 5% de uno o más de los tres nutrientes primarios requeridos por las plantas; su presentación puede ser líquida o sólida en forma gránulos, píldoras, cristales, polvo de grano grueso, compacto o fino; son usados para proveer los nutrientes que requiere un cultivo, y así aumentar la



eficiencia y crecimiento aéreo y radicular de la planta. En los últimos años, se ha aumentado el uso a nivel mundial, debido al incremento de la población, que necesita satisfacer las demandas nutricionales, y por tanto se necesita su uso, pues los nutrientes que requieren las plantas los toman del aire y del suelo, si esos nutrientes son escasos así mismo el crecimiento de la planta es limitado²⁰. Los fertilizantes mejoran la baja fertilidad de los suelos que han sido sobreexplotados, su efecto en el suelo es cambiar la cantidad de reservas disponibles para mejorar el enraizamiento, lograr resistencia frente al estrés hídrico, y otros factores ambientales²¹. A pesar de que son necesarios, el masivo uso de fertilizantes genera daños ambientales, por lo que contienen metales pesados y radionucleidos, que posteriormente se acumulan en el agua y también deteriora el producto ya que las sustancias tóxicas también se acumulan en el fruto²³.

2.9 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal

Durante la interacción planta-microorganismo, muchos microorganismos pueden ejercer un efecto benéfico sobre la planta promoviendo su crecimiento e incrementando la tolerancia al estrés biótico y abiótico³. Un claro ejemplo, lo constituye el grupo de hongos promotores de crecimiento de plantas (PGPF) como micorrizas arbusculares, ectomicorrizas y hongos endófitos, y las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR)³. Los géneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum* y *Azotobacter*, son clasificados entre las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal extracelular, las cuales pueden existir en la rizósfera, sobre el rizoplaneo o en el espacio entre las células de la corteza de la raíz, desde donde pueden ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, a través de diferentes mecanismos²⁴.

2.10 Generalidades de *Pseudomonas* spp.

TAXONOMÍA

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales



Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*²⁵

Los miembros del género *Pseudomonas* se caracterizan por ser bacilos Gram negativos aerobios, rectos o ligeramente curvos con motilidad, debido a la presencia de uno o varios flagelos polares, no forman esporas y generalmente son catalasa positivo. Se encuentran ampliamente distribuidos en suelo, rizosfera, agua dulce y marina. Aunque algunas especies son patógenas para los animales (*P. aeruginosa*), y plantas (*P. syringae*), se conoce que otras *Pseudomonas* tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal como *P. putida* y *P. fluorescens* que se caracterizan por tener una versatilidad bioquímica²⁶.

2.11 Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos tienen la capacidad de vivir en ambientes que se consideraban hostiles para el crecimiento de organismos vivos, su clasificación se basa dependiendo de la condición física o extrema del ambiente en la que se desarrollen. Entre los hábitats de los microorganismos extremófilos se encuentran los mares polares fríos, glaciares alpinos, manantiales calientes, lagos salinos y ambientes con pH extremo. Los termófilos crecen en rangos de 45°C a 80°C, los psicrófilos tienen una temperatura óptima de crecimiento por debajo de 10 °C, acidófilos que crecen en lugares con pH por debajo de 5, alcalófilos que crecen con un pH óptimo mayor a 8, xerófilos que viven en ausencia de agua, osmófilos que son capaces de vivir a altas presiones osmóticas, radiófilos que resisten altos niveles de radiación, metalófilos que tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones de metales pesados; halófilos que habitan en medios hipersalinos, de 5 % a 30 % de NaCl y piezófilos, antes llamados barófilos, los cuales toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm²⁷.

2.12 Microorganismos psicrófilos

Los psicrófilos forman parte del amplio grupo de microorganismos extremófilos, están presentes en los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya) y se clasifican como psicrotolerantes si crecen en temperaturas superiores 25°C, y psicrófilos si crecen a



temperaturas entre 10 a 20°C, aunque pueden crecer a temperaturas por debajo de 5°C; en estas temperaturas su actividad metabólica es necesaria para asegurar procesos de descomposición de materia orgánica y proporcionar nutrientes a las plantas, por lo que juegan un papel fundamental en el ciclo del carbono de los ecosistemas polares. Estos organismos se encuentran en ambientes fríos como regiones polares, sedimentos marinos y zonas montañosas que durante el invierno alcanzan temperaturas de 5°C o menos²⁸.

Los microorganismos psicrófilos tienen la capacidad de establecer interacción con plantas, y producir diversos compuestos metabólicos que promueven el crecimiento vegetal como hormonas (AIA), fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de enzimas, metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana, y muchos otros que confieren resistencia a estrés abiótico^{29,30}. Además, han desarrollado mecanismos moleculares y fisiológicos que les permiten sobrevivir en dichos ambientes, como la producción de proteínas de choque frío, proteínas anticongelantes y solutos compatibles para contrarrestar la presencia de cristales de hielo, enzimas como la ACC desaminasa (desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), que disminuye las concentraciones de etileno e incrementa la disponibilidad de amonio en la rizosfera, la producción de exopolisacáridos para proteger las células de especies reactivas de oxígeno (ROS), mejorar la formación de biopelículas y la capacidad de degradar compuestos complejos entre otros³¹.

2.13 Factores reguladores del crecimiento vegetal

2.13.1 Producción de auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos reguladores del desarrollo de las plantas que influyen en el crecimiento, la división celular y la formación de raíces²⁸. Una de las principales auxinas o fitohormona que se encuentran en la planta es el ácido indolacético (AIA), el cual está encargado de controlar diversos procesos fisiológicos como la elongación de la raíz y división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad³².



De acuerdo a varios estudios realizados se ha demostrado que las bacterias tienen un papel fundamental en modular las concentraciones de AIA gracias a las diferentes rutas biosintéticas que pueden llegar a tomar, las más importantes en las bacterias son las vías anabólicas de indol-3-acetamida (IAM) y de indol-3-piruvato (IPA), estas rutas metabólicas dependen del triptófano, la vía IAM está presente en bacterias fitopatógenas mientras que la vía IPA principalmente se encuentra en bacterias promotoras del crecimiento (PGPB)³².

La producción de AIA por la vía IPA comienza con la conversión del triptófano a ácido indol-3-pirúvico (IPA) por una aminotransferasa, el cual se descarboxila a ácido indol-3-acetaldehído (AIAld) por la indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC), siendo esta la etapa limitante de la síntesis y en la etapa final el AIAld es oxidado a AIA por la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa³².

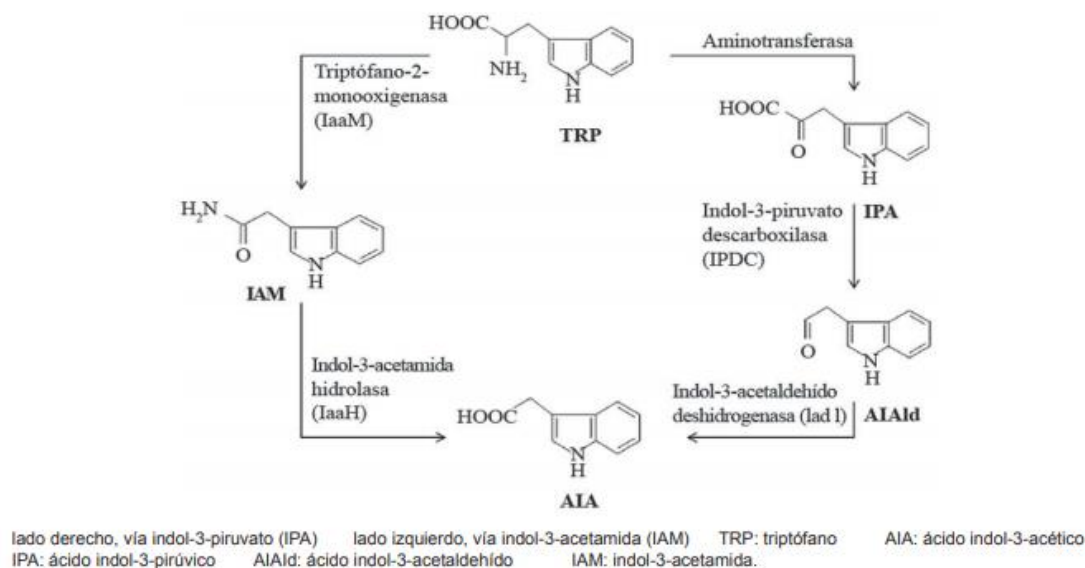


Figura 1. Rutas metabólicas del ácido indolacético³².

2.13.2 Solubilización de fosfato

El fósforo es el segundo elemento más necesario para la producción agropecuaria, después del nitrógeno, siendo esencial para el crecimiento de plantas ya que constituye más de 0.2% del peso seco de la planta. Este elemento lo adquieren a partir del suelo con pH 6.5 en forma



inorgánica, en estado soluble como fosfato monobásico (H_2PO_4^-) y dibásico (HPO_4^{2-})³⁶. En el suelo, la mayor parte de fósforo se encuentra asociado a compuestos orgánicos e inorgánicos formando complejos minerales en forma insoluble, siendo una fuente importante pero no disponible para la nutrición de las plantas³³.

Entre las diferentes formas de fósforo que se encuentran en el suelo, las bacterias solubilizadoras de fosfato solubilizan los fosfatos inorgánicos como el fosfato de calcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], el fosfato férrico [FePO_4] y el fosfato de aluminio [AlPO_4], mediante la producción de iones hidroxilos, sideróforos y ácidos orgánicos en especial glucónicos y carboxílicos³³.

2.13.3 Fijación de nitrógeno

Todos los organismos requieren nitrógeno para sintetizar biomoléculas, no obstante, la principal fuente que se encuentra en la naturaleza es el nitrógeno atmosférico, forma en la que no es accesible a la mayoría de organismos vivos. Para ello, es necesaria la presencia de microorganismos diazotróficos, ya que ellos realizan la fijación biológica de nitrógeno, pues, reducen el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4), para que posteriormente las plantas lo integren en los aminoácidos y proteínas, además, produzcan malato, un compuesto orgánico útil en rutas metabólicas³⁴.

La reducción del nitrógeno atmosférico se realiza mediante la acción de la enzima nitrogenasa, y además, requiere de un coste energético para romper los enlaces que unen los átomos de nitrógeno, se necesita 16 moléculas de ATP para reducir un átomo de N_2 .



2.13.4 Catalasa

En las células vegetales es inevitable la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, por causa de procesos metabólicos aeróbicos tales como la respiración y la fotosíntesis. La formación de ROS está representada por grupos O_2^- , H_2O_2 y OH^- , el aumento a nivel intracelular puede suceder por cuestión de factores



externos como la alta luminosidad, sequía, estrés mecánico, bajas y altas temperaturas, si sucede un desequilibrio entre antioxidantes y ROS puede generar estrés oxidativo (EO) en la planta. Por ello, las plantas han adoptado estrategias antioxidantes como los mecanismos celulares para eliminar dichos compuestos tóxicos aumentando las defensas antioxidantes³⁶.

Los mecanismos de detoxificación se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos, la detoxificación enzimática está mediada por: catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y monodehidroascorbato reductasa; y la detoxificación no enzimática está mediada por ácido ascórbico y por la acción de pigmentos como los flavonoides, antocianinas y carotenos³⁶.

Las catalasas son enzimas tetraméricas que catalizan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2), una molécula de catalasa tiene la capacidad de convertir aproximadamente seis millones de moléculas de H_2O_2 en H_2O y O_2 por minuto³⁶.

2.13.5 Motilidad

Algunas bacterias tienen mecanismos de autolocomoción debido a que cuentan con apéndices rotativos largos y finos denominados flagelos, estos están constituidos por un filamento que contiene una proteína globular llamada flagelina, dicho filamento se encuentra unido a un gancho, y la otra porción es el cuerpo basal que fija al flagelo en la pared celular y membrana plasmática. Los flagelos pueden adoptar diferentes disposiciones y permiten la clasificación de bacterias en: monotricas que tienen un flagelo polar, anfotricas que tienen un flagelo en cada extremo, lofotricas que tienen dos o más flagelos en cada extremo y peritricas donde los flagelos se distribuyen alrededor de la célula³⁷.

El movimiento que realizan las bacterias es debido a la presión que ejerce el flagelo en el medio circundante, y además, su movimiento se basa en estímulos que dependen de gradientes de concentración, lo cual le permite responder a un estímulo favorable o para huir de un ambiente desfavorable, este mecanismo es denominado taxis. Cuando los estímulos son generados por sustancias químicas se le denomina como quimiotaxis y cuando es por estímulos luminosos se denomina fototaxis. Las bacterias móviles cuentan con unos



receptores que permiten responder a los estímulos, si la señal quimiotáctica es positiva genera una atracción y la bacteria se desplaza en dirección al estímulo, y si se genera una repulsión es porque la señal quimiotáctica es negativa y la bacteria se aleja del estímulo. Las bacterias que se encuentran en el suelo responden a un gradiente de compuestos químicos liberados por las raíces de las plantas mediante la atracción quimiotáctica, esa quimiotaxis genera una competitividad entre las bacteria flageladas en la colonización de la superficie de las raíces³⁸.

3. Diseño metodológico

3.1 Universo, población y muestra

Universo: Microorganismos y plantas.

Población: Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPM) y hortalizas.

Muestra: *Pseudomonas spp.* psicrófilas con posible capacidad de promover el crecimiento vegetal, donadas por el Dr. Ramón Batista García de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos-México. Las 3 cepas identificadas por 16s ribosomal, fueron aisladas del volcán Xinentécatl (nevado de Toluca), a partir de rizósfera de una planta nativa que se encontraba creciendo en sustrato arcilloso, sobresaliendo entre un montículo de nieve, y a partir del mismo sitio, a una distancia de 40 cm aproximadamente se tomó una muestra de suelo nevado (5 cm debajo de la superficie); y semillas de Tomate Chonto Río Grande (*Solanum lycopersicum*).

3.2 Hipótesis, variables e indicadores

La hipótesis que se postuló en esta investigación fue “Las *Pseudomonas* psicrófilas producirán factores de promoción de crecimiento vegetal, y tendrán efecto positivo en el crecimiento de plantas de tomate”.

Variables:



- Dependiente: Crecimiento de las plantas de tomate tratadas con las *Pseudomonas* psicrófilas.
- Independiente: Concentración en unidades formadoras de colonia (UFC) de las cepas de *Pseudomonas* psicrófilas.

Indicadores:

Medición de la longitud del tallo, raíz y la planta, medición del peso seco y fresco de la raíz y el tallo, y número de hojas.

3.3 Técnicas y procedimientos

3.3.1 Conservación, adaptación y recuperación de las *Pseudomonas* psicrófilas

Las cepas de *Pseudomonas* spp psicrófilas provenientes del volcán popocatepetl (Puebla, México) inicialmente fueron conservadas en glicerol a -70.0°C . Para su adaptabilidad a frío, las cepas conservadas a partir de gliceroles fueron sembradas en agar nutritivo y posteriormente incubadas a 8.0°C (nevera) durante 24.0 a 96.0 horas. Después del tiempo de incubación, se verificó la pureza de crecimiento de las cepas, y a partir de este cultivo se realizó prueba de adaptabilidad a temperatura de 18.0 a 22.0°C , ya que las pruebas cuantitativas de metabolitos se realizan en esas temperaturas. Para ello, cada cepa se sembró en 3.0 mL caldo nutritivo, se incubaron a 22.0°C durante 24.0 a 96.0 horas, a 200.0 rpm, y se verificó la capacidad de crecimiento en estas temperaturas.

3.3.2 Determinación de factores promotores de crecimiento vegetal

Se determinaron factores de promoción de crecimiento vegetal como la producción de ácido indolacético, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, actividad catalasa y motilidad en tres cepas de *Pseudomonas* spp. psicrófilas. Todas las pruebas se realizaron por triplicado, siguiendo los siguientes protocolos:

- **Ácido indolacético (AIA):** Se evaluó mediante la metodología propuesta por Glickman y Dessaux (1995). La caracterización cualitativa se realizó de la siguiente manera: Cada cepa de *Pseudomonas* spp (2.1, 2.2, 2.3), fue inoculada en agar LB



(Luria Bertani) suplementado con triptófano, y se incubaron por 48.0 horas a temperatura ambiente (14.0-18.0°C), pasado este tiempo se colocó sobre la superficie de la colonia papel de nitrocelulosa durante 24.0 horas en condiciones de total oscuridad, y posteriormente se retiró el papel y se adicionó 1.0 ml de reactivo de Salkowsky (solución de FeCl_3 , H_2SO_4 y H_2O). El cambio de coloración del papel a color rosa indica presencia de compuestos tipo indólicos. Como control negativo, cajas sin inocular, y control positivo cepa de *Azospirillum spp.*

La evaluación cuantitativa de AIA, se determinó inoculando cada cepa en 5.0 ml de medio líquido LB suplementado con triptófano, los tubos se incubaron durante tres días a temperatura ambiente (14.0-18.0°C) a 200 rpm, posteriormente, se tomó 1.0 ml del cultivo y se centrifugó por 5.0 minutos a 10.000 rpm, se descartó el pellet y al sobrenadante se le agregó 750.0 μl del reactivo de Salkowsky (solución de FeCl_3 , H_2SO_4 y H_2O), luego se mantuvo en agitación por 30.0 minutos a temperatura ambiente (14.0-18.0°C) para que reaccionara con el reactivo, la medición de la densidad óptica se realizó en espectrofotómetro a 500.0 nm. Se utilizó medio líquido LB suplementado con triptófano sin inocular como blanco. La concentración de auxina se determinó usando una curva estándar de AIA (0.0- 1000 $\mu\text{g/ml}$)³⁹.

- **Solubilización de fosfatos:** Se evaluó mediante la metodología propuesta por Sundara Rao y Sinha (1963) (Anexo 1). Se determinó la capacidad de solubilización de fosfatos cualitativamente mediante la inoculación de cada cepa de *Pseudomonas spp* (2-1, 2-2, 2-3), en medio SRS ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, glucosa, extracto de levadura, púrpura de bromocresol, agar, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, pH 7.0-7.2), y se incubaron por 5 días a temperatura ambiente (14-18°C). Este medio contiene como única fuente de fósforo, fosfato tricálcico, una sustancia altamente insoluble, la formación de un halo alrededor de la colonia indica la solubilización de fosfatos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) por parte del microorganismo⁴⁰ y acidificación del medio que se evidencia por cambio de color del medio (viraje a amarillo); como control negativo, cajas sin inocular, y control positivo cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO). Para la determinación cuantitativa se utilizó la metodología



propuesta por Chen et al. 2006, Nautiyal et al. 1999 y Kadiri et al.2013 (Anexo 2), se realizó un preinóculo de las cepas en 6.0 ml de caldo nutritivo y se incubaron a 22.0°C durante 48.0 horas, se centrifugó a 7000 rpm por 5.0 minutos, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en agua destilada estéril y se ajustó el inóculo a una absorbancia de 1.0 en espectrofotómetro a 541.0 nm. 100 µl del inóculo se adicionaron a en tubos Falcon que contenían 15.0 ml del medio líquido NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) (glucosa, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, agar; pH 7.0) para llevar a incubación a 22°C por 14.0 días, luego se centrifugó a 5000 rpm por 5.0 minutos y se midió el pH en el sobrenadante del medio. La cuantificación de fosfato soluble se realizó usando el Kit de Fosfatos Spectroquant (Merck) (Anexo 3), y el equipo fotómetro NOVA 60, mediante una curva estándar de fosfatos de 7, 12, 17, 22 y 27 mg/l.

- **Prueba de fijación de nitrógeno:** Las cepas de *Pseudomonas* psicrófilas se evaluaron cualitativamente con la metodología propuesta por Medhin H. Kifle y Mark D. Laing 2016 (Anexo 4) mediante su capacidad de crecer en medio NF (Nitrogen-free) carente de nitrógeno (Sacarosa, K_2HPO_4 , NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , K_2SO_4 , agar semisólido). Se realizó una siembra por estría y se incubó a temperatura ambiente (14.0-18.0°C) durante 8.0 días. El crecimiento indica la capacidad del microorganismo de fijar nitrógeno.
- **Producción de amonio:** Las cepas de *Pseudomonas spp* (2.1, 2.2 y 2.3) se analizaron cuantitativamente para producción de amonio utilizando la metodología propuesta por Ahmad et al. 2008 (Anexo 5). Se realizó una siembra en agua peptona de las cepas que se encontraban en caja de petri y se llevaron a incubación a 22.0°C durante tres días. La cuantificación de amonio se realizó usando el Kit de Amonio Spectroquant (Merck) y fotómetro NOVA 60, usando una curva estándar de amonio de 0,1, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3 mg/l.
- **Producción de catalasa:** La producción de catalasa se evaluó mediante prueba en portaobjeto, mezclando una asada de microorganismo con el sustrato (H_2O_2 3.0 M).



Una prueba positiva se evidencia por la formación de burbujas, indicando la producción de esta enzima que degrada el sustrato en H₂O y O₂.

- **Prueba de motilidad:** Se evaluó la motilidad de las cepas de *Pseudomonas spp* (2.1, 2.2 y 2.3) según el protocolo de Boyer 2008 (Anexo 6), se sembró 10.0 µl de la suspensión bacteriana en medio nutritivo semisólido al 0,85% y se incubaron por 5.0 días a temperatura ambiente. Son positivas las cepas que presenten desplazamientos alrededor del inóculo simulando la formación de halo, y son negativas aquellas cepas en las que solo se vea crecimiento en el lugar donde se inoculó el medio.

3.3.3 Promoción de crecimiento de tomate por *Pseudomonas spp.* psicrófilas

- **Ajuste del inóculo bacteriano:** Las cepas se incubaron en 3.0 ml caldo nutritivo durante 48.0 horas a 200.0 rpm y a 22.0°C, luego se centrifugó y el pellet se disolvió con agua destilada, se transfirieron 50.0 µl de la biomasa en tubos falcon que tenían 20.0 ml de caldo nutritivo; posteriormente, el inóculo se ajustó a una densidad óptica de 0.160 en una longitud de onda de 546 nm (Anexo 7).
- **Ensayo biológico:** Para determinar la capacidad de promoción de crecimiento de las cepas de *Pseudomonas spp* se realizó la siguiente metodología (Anexo 7):
 - **Desinfección de las semillas:** Se realizó la desinfección de las semillas con NaCl 3% durante 5 minutos, luego se realizaron tres lavados con agua estéril, posteriormente con alcohol 70% durante 5 minutos y por último se lavaron tres veces con agua destilada.
 - **Inoculación de las semillas:** Luego de la desinfección, se colocaron 20 semillas en tubos falcon conteniendo 17 ml de inóculo ajustado a 0.160, de cada cepa de *Pseudomonas spp* psicrófilas (2.1-2.2-2.3), 20 semillas para el control positivo (PAO), y 20 para el control negativo. La interacción se dejó por 2 horas en agitación a 100 rpm.
 - **Siembra:** después de la interacción, las semillas se sembraron en germinadores de 72 pozos, con turba doblemente esterilizada a 121.0°C, una semilla por pozo. Las semillas se regaron con 4.0 ml de solución Hoagland cada día intermedio, durante 15.0 días hasta su germinación y luego se transfirieron a



macetas individuales (una planta/maceta) en suelo doblemente esterilizado a 121.0°C. Las plantas fueron regadas cada tres días por semana con solución Hoagland sobre la tierra y agua destilada fue colocada en la base del vaso, durante 45.0 días.

- **Determinación de variables:** Después de 45.0 días se retiraron las plantas de las macetas para determinar las variables de longitud de la planta, raíz y tallo, número de hojas, peso fresco y seco de raíz y tallo (Anexo 8).
- **Análisis estadístico:** Las variables obtenidas a partir de la medición de longitud y peso de las plantas, se analizaron con la prueba de la U de Mann-Whitney Wilcoxon test.

3.3.4 Amplificación del gen 16S

- **Extracción de ADN:** Para cada cepa se realizó el siguiente protocolo: se colocó un inóculo en 5.0 ml de medio líquido LB a temperatura ambiente en agitación constante por 48.0 horas, Después de la incubación el cultivo se centrifugó por 10.0 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendió el pellet en 500.0 µl de buffer SET pH 8.0, se adicionó 20.0 µl de SDS al 20% y se incubó por 5.0 minutos a 80°C sin agitación; después se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se adicionó 110.0 µl de agua destilada esteril y 70.0 µl de acetato de potasio pH 4.8, se mezcló, se adicionó 350.0 µl de fenol saturado, se volvió a mezclar suavemente y luego se agregó 350.0 µl de cloroformo-alcohol-isoamílico, se volvió a mezclar y se centrifugó 5.0 minutos a 12000 rpm, el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf y se repitió la adición de fenol:cloroformo:isoamílico, se mezcló y se centrifugó 5.0 minutos a 12000 rpm, de nuevo el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf y se adicionó 700.0 µl de isopropanol, la mezcla fue centrifugada por 3.0 minutos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó tres veces con 1.0 ml de etanol al 70.0%, se dejó secar a temperatura ambiente, y por último, el pellet fue resuspendido en 40.0 µl de Tris-HCL pH 8.5.
- **Electroforesis en gel de agarosa al 1%:** A partir de un stock de TAE al 50X se dispuso a preparar 400.0 ml de TAE al 1X, luego se preparó el gel de agarosa al 1%



en 25.0 ml de TAE al 1X, agregando 1.0 μ l de solución reveladora (hydragren). Posteriormente, se preparó cada una de las muestras para realizar la corrida en el gel: en un eppendorf se agregó 6.0 μ l de la muestra (extracción de ADN de las cepas o marcador) y 2.0 μ l de buffer de carga, se mezcló, y se cargaron en cada uno de los pozos del gel de agarosa, la corrida electroforética se realizó a 100.0 voltios aproximadamente 1.0 hora. A partir de cada muestra de DNA genómico de las cepas, se amplificó el gen 16S ribosomal, el siguiente protocolo: En un eppendorf se agrego 2,5 μ l de buffer, 1,25 μ l de MgCl₂, 0,5 μ l de dNTPs, 0,06 μ l del primer Fw, 0,06 μ l del primer Rv, 0,2 μ l de Taq DNA polimerasa (invitrogen), 19,43 μ l de agua destilada estéril y 1.0 μ l de DNA genómico de una cepa, para obtener un volumen final de 25.0 μ l. Se dispuso a introducir cada eppendorf en el equipo PCR termociclador y se determinó el protocolo ya preestablecido de los ciclos para la amplificación.

4. Resultados

4.1 Determinación de factores promotores de crecimiento vegetal en *Pseudomonas* psicrófilas

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, ejercen su efecto positivo sobre las plantas a través de diferentes mecanismos, los cuales han sido ampliamente estudiados.

4.1.1 Producción de auxinas

Se determinó cualitativamente la producción de AIA, las cepas de *Pseudomonas* psicrófilas (2.1, 2.2 y 2.3), fueron negativas a la prueba cualitativa, y el control positivo *Azospirillum spp.* presentó una coloración rosa, sobre el papel nitrocelulosa (figura 2), indicando la presencia indoles. En el análisis cuantitativo, los resultados mostraron que todas las cepas produjeron auxinas con valores de 574.4, 424.9 y 233.7 μ g/ml, para las cepas *Pseudomonas spp.* 2.1, 2.2, 2.3 respectivamente, y 612.7 μ g/ml para el control positivo *Azospirillum spp* (tabla 3).

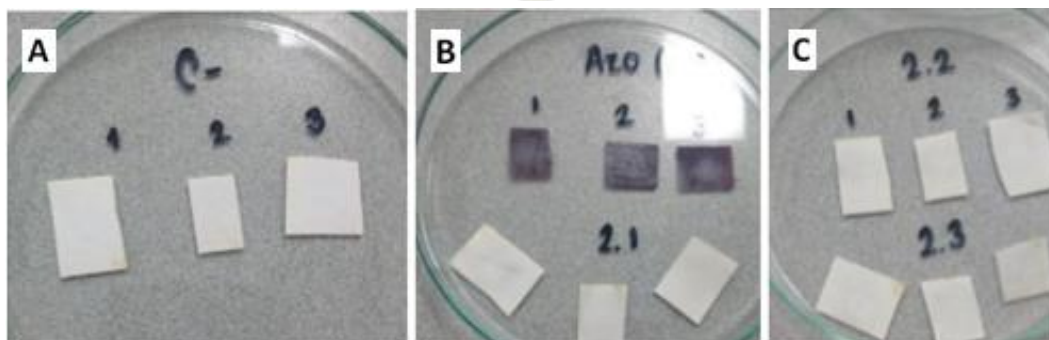


Figura 2. Determinación cualitativa de AIA. (A) Control negativo, sin inóculo. (B) Control positivo (*Azospirillum* spp) en la parte superior y cepa 2.1 (*Pseudomonas* spp) en la parte inferior. (C) Cepa 2.2 (*Pseudomonas* spp) en la parte superior y cepa 2.3 (*Pseudomonas* spp) en la parte inferior.

Tabla 3. Concentraciones de producción de AIA por *Pseudomonas* psicrófilas.

PRUEBA CUANTITATIVA- PRODUCCIÓN DE AIA (µg/ml)	
CEPA	CONCENTRACIÓN (µg/ml)
2.1	574.4
2.2	424.9
2.3	233.7
<i>Azospirillum</i> sp.	612.7
Control negativo	-



4.1.2 Solubilización de fosfatos

Se evaluó cualitativamente la capacidad de solubilización de fosfatos de las cepas mediante la inoculación en medio sólido SRS. En la figura 3 se observa claramente que el control PAO y las cepas 2.1 y 2.2 formaron halos de solubilización del fosfato y acidifican el medio generando viraje de color lila a amarillo. En la cepa 2.3 solo se observó acidificación del medio. Para el análisis cuantitativo se midió el pH del medio y se obtuvo una acidificación por parte de todas las cepas (2.1, 2.2 y 2.3), luego se realizó la lectura en el fotómetro NOVA 60, demostrando que las cepas tenían la capacidad de solubilizar fosfatos con valores de 81,6 mg/l, 199,6 mg/l y 118 mg/l, para las cepas *Pseudomonas spp* 2.1, 2.2, 2.3 respectivamente, superando los valores del control positivo PAO 77.6 mg/l (tabla 4).

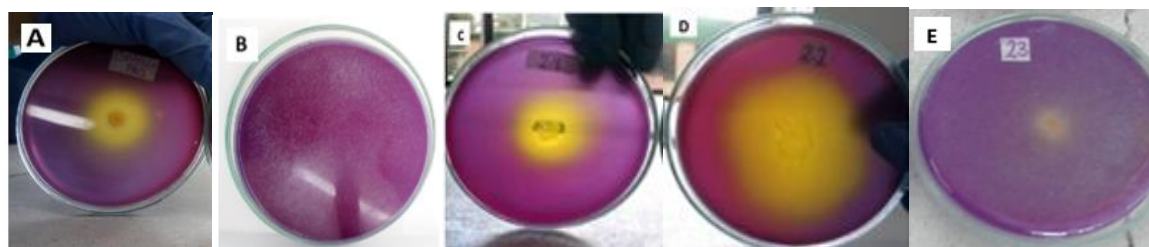


Figura 3. Prueba cualitativa de solubilización de fosfatos. (A) Control positivo (PAO). (B) Control negativo, medio sin inocular. (C) Cepa 2.1 (D) Cepa 2.2 (E) Cepa 2.3 *Pseudomonas psicrófilas*.

Tabla 4. Concentraciones de fosfato soluble por las *Pseudomonas psicrófilas*.

PRUEBA CUANTITATIVA- FOSFATO SOLUBLE (mg/l)	
CEPA	CONCENTRACIÓN (mg/l)
2.1	81.8
2.2	199.6
2.3	118



PAO	77.6
Control negativo	-

4.1.3 Fijación de nitrógeno

La capacidad de fijación de nitrógeno por las *Pseudomonas spp* se realizó en medio NF, el cual es carente de nitrógeno. Los resultados del ensayo mostraron que solo la cepa 2.2 creció en el medio NF, lo que indica su capacidad de fijar nitrógeno (figura 4B), igual al control positivo PAO (figura 4D), pero este con un crecimiento escaso.

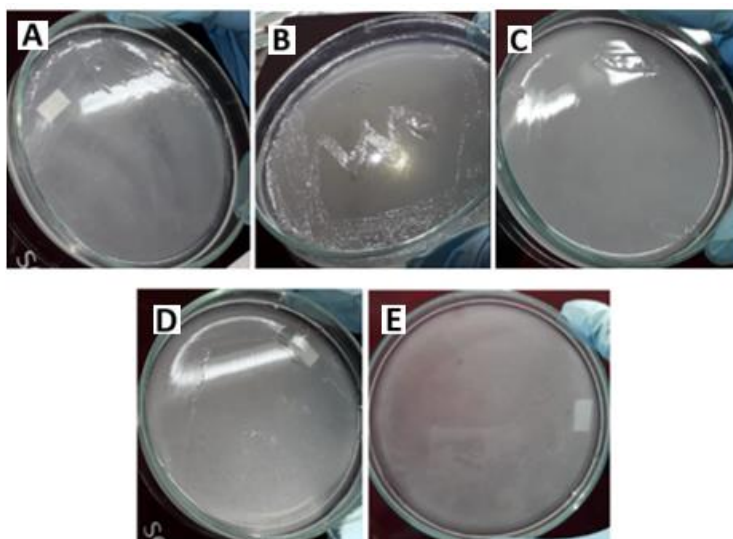


Figura 4. Prueba de fijación de nitrógeno. (A) Cepa 2.1. (B) Cepa 2.2. (C) Cepa 2.3 (D) Control positivo (PAO) (E) Control negativo (Caja sin inocular).

4.1.4 Producción de amonio

Las cepas de *Pseudomonas spp* (2.1, 2.2 y 2.3) se analizaron para la producción cuantitativa de amonio, utilizando el kit de amonio Spectroquant (Merck). En la tabla 5, se observa que la



cepa 2.2 produjo la concentración más alta con 0.21 mg/l comparada a la cepa 2.1 y 2.3. Sin embargo, los valores de la cepa 2.2 estuvieron por debajo al control positivo cepa PAO (0.25 mg/l).

Tabla 5. Concentraciones de producción de amonio por *Pseudomonas* psicrófilas.

PRODUCCIÓN DE AMONIO (mg)	
CEPA	CONCENTRACIÓN (mg/l)
2.1	0.07
2.2	0.21
2.3	0.05
PAO	0.25
Control negativo	-

4.1.5 Catalasa

La producción de enzima catalasa por las cepas evaluadas se realizó tomando como sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2 3M). En la figura 5 se observa que todas las cepas y el control dieron positivos a la reacción de esta prueba, evidenciado por la formación de burbujas.

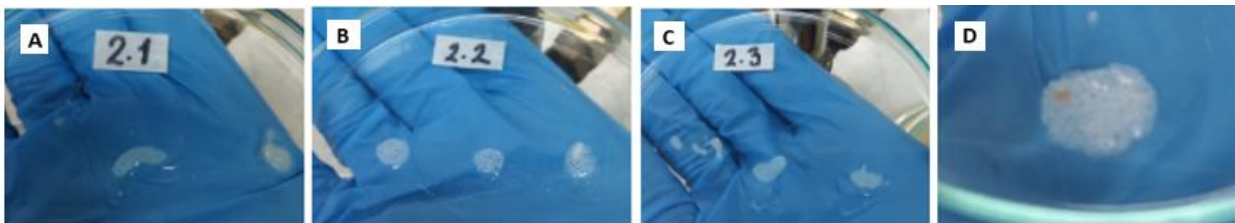


Figura 5. Prueba de catalasa. (A) Cepa 2.1. (B) Cepa 2.2. (C) Cepa 2.3 (D) Control positivo (PAO).



4.1.6 Motilidad

La prueba de motilidad fue realizada en agar nutritivo semisólido 0.85%. Los resultados observados en la figura 6, muestra la motilidad positiva por desplazamiento alrededor del inóculo para todas las cepas evaluadas y el control positivo.

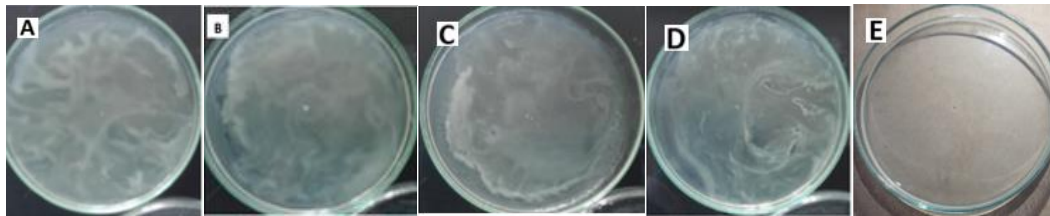


Figura 6. Prueba de motilidad. (A) Ceba 2.1. (B) Ceba 2.2. (C) Ceba 2.3. (D) PAO, control positivo (E) Control negativo, medio de cultivo sin inocular.

En la siguiente tabla (tabla 6 y 7), se resume los datos de la pruebas cualitativas y cuantitativas de metabolitos para las cepas evaluadas.

Tabla 6. Resultado de pruebas cualitativas de factores promotores de crecimiento por las *Pseudomonas* psicrófilas

PRUEBAS CUALITATIVAS DE PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL						
Cepa	Producción de AIA	Solubilización de fosfato		Fijación de nitrógeno	Producción de catalasa	Motilidad
		A*	S*			
2.1	-	+	+	-	+	+
2.2	-	+	+	+	+	+
2.3	-	+	-	-	+	+

A*: Acidificación/ S*: Solubilización

En la siguiente tabla (tabla 7) se sintetizaron los resultados obtenidos en las pruebas cuantitativas de los factores promotores de crecimiento vegetal.



Tabla 7. Resultado de pruebas cuantitativas de factores promotores de crecimiento por las cepas de *Pseudomonas* psicrófilas

PRUEBAS CUANTITATIVAS DE PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL					
Cepa	Producción de AIA	Solubilización de fosfato	Producción de amonio	Producción de catalasa	Motilidad
2.1	+	+	+	N/A	N/A
2.2	+	+	+	N/A	N/A
2.3	+	+	+	N/A	N/A

N/A No aplica

4.2 Porcentaje de germinación plantas de tomate

Para el ensayo de germinación, las semillas pretratadas con el inóculo de cada cepa durante 2 horas, fueron sembradas en germinadores con turba estéril, la germinación se dejó durante 15 días, 20 semillas por cada cepa de estudio (2.1, 2.2 y 2.3), control negativo (sin inóculo) y control positivo (*Pseudomonas aeruginosa*, PAO); luego de los 15 días se contó el número de plántulas que habían germinado y que tuvieran las 2 hojas verdaderas (figura 8).



Figura 7. Germinación plántulas de tomate durante 15 días.

La cepa 2.2 produjo el 95% de germinación, superando al control PAO con 90%. La cepa 2.3 90% , la cepa 2.1 80% y el control negativo sin inóculo 85% de germinación de semillas de tomate (tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de germinación de plántulas de tomate, estimuladas con *Pseudomonas psicrófilas* y *Pseudomonas aeruginosa* (PAO)

CEPA	NÚMERO DE PLÁNTULAS	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN
2.1	16	80%
2.2	19	95%
2.3	18	90%
C+	18	90%
C-	17	85%

4.3 Evaluación de promoción de crecimiento



El efecto de promoción de crecimiento de tomate por las *Pseudomonas* ssp, se registró después de 45 días de crecimiento de las plántulas, tomando datos de las variables en estudio; peso fresco y seco de la raíz y el tallo, longitud de raíz, tallo y planta, además del número de hoja. Para el peso fresco de raíz las cepas 2.1, 2.2, y el control PAO, se comportaron igual al control no inoculado, con valores de 0,02 gramos para todas (figura 8), sin mostrar diferencias significativas. La cepa 2,3 produjo un valor de 0,01 g en peso fresco de la raíz, mostrando un efecto negativo respecto al control no inoculado con un valor ($p < 0.05$) (figura 8).

Frente a peso seco de raíz, todas las *Pseudomonas* psicrófilas y el control PAO, produjeron valores de 0,002 g similar al control de 0,0019 g (figura 8), por tanto no hay efecto positivo para esta variable.

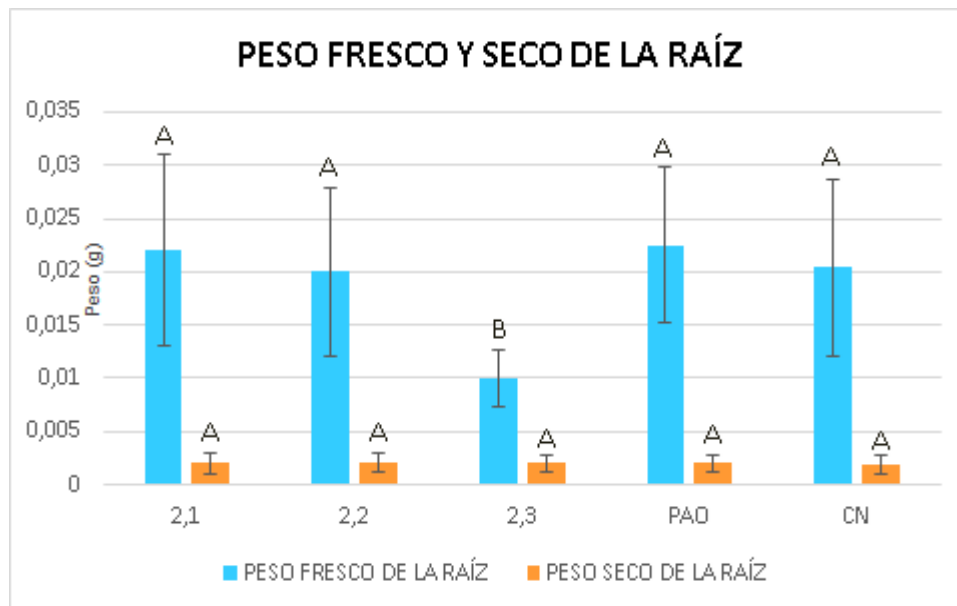


Figura 8. Peso fresco y seco de la raíz de las plantas de tomate.

Respecto al peso fresco del tallo, ninguna de las plántulas tratadas con las *Pseudomonas* psicrófilas y la PAO tuvieron una diferencia estadísticamente significativa frente a las plántulas que no tuvieron tratamiento alguno. El valor más alto en peso fresco del tallo lo



produjo la cepa 2.3 con 0,17 gramos, y el más bajo la cepa 2.1 con 0,13 g frente a 0,15 g del control sin inocular (figura 9), por tanto las cepas no mostraron un efecto positivo sobre esta variable.

Para peso seco del tallo, los datos 0,008, 0,015 y 0,009 g de las cepas 2.1, 2.2, y 2.3 respectivamente, fueron similares al control negativo (0,010 g) (figura 9). El control positivo PAO, mostró un mejor efecto para esta variable con 0,02 g, aunque frente al control negativo no hubo diferencias significativas.

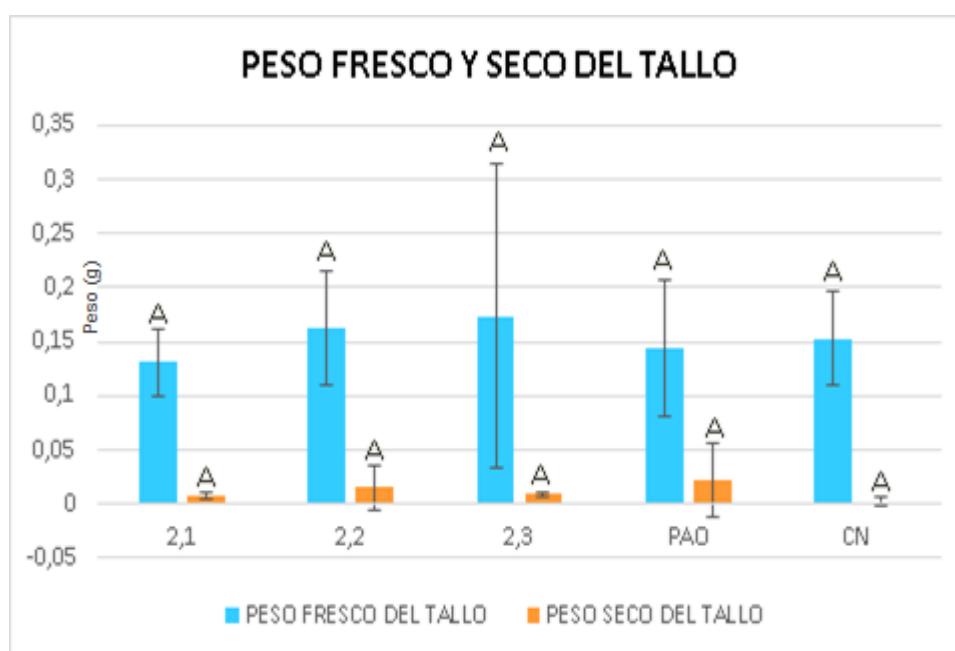


Figura 9. Peso fresco y seco del tallo de las plantas de tomate.

Para la variable de longitud del tallo, raíz y total, las cepas de *Pseudomonas* 2.1, 2.2 y 2.3 produjeron valores similares al control no inoculado. La longitud del tallo estuvo entre 9,3 a 10,3 cm para las *Pseudomonas* psicrófilas frente a 9,7 cm del control (figura 10). Sin embargo, la mayor longitud obtenida de las plántulas en estudio fueron las que tuvieron tratamiento con la cepa 2.2 (10.3 cm) superando la medida de las que tuvieron tratamiento con *Pseudomonas aeruginosa* (10.19 cm).

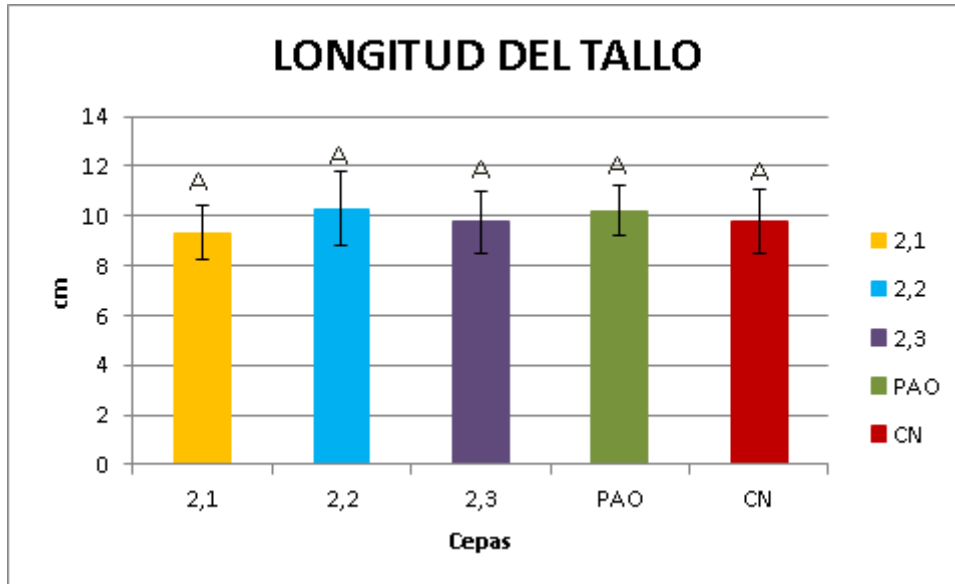


Figura 10. Longitud del tallo de las plantas de tomate.

Las longitudes obtenidas de la raíz no generaron diferencias significativas de las cepas 2.1 (4.74 cm), 2.2 (5.18 cm) y 2.3 (4.98 cm) respecto al control que no tuvo tratamiento (5.23 cm) (figura 11).

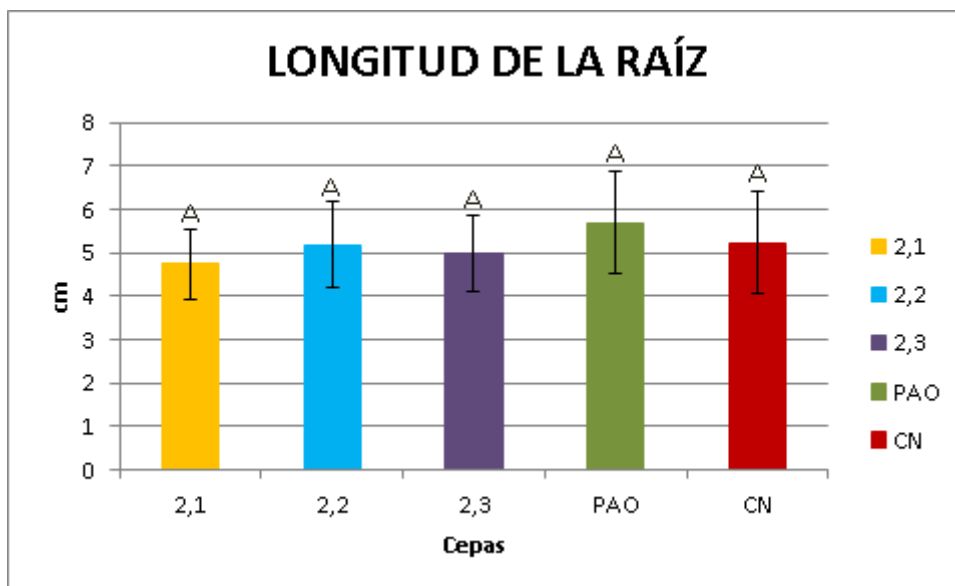


Figura 11. Longitud de la raíz de las plantas de tomate.



En la longitud total de las plantas se observó que los valores de las cepas 2.2 (15,35 cm) y 2.3 (14,74 cm), estuvieron cercanos al control no inoculado (15,03 cm), mostrando un efecto igual. La cepa 2.1 mostró un efecto negativo sobre la planta con un valor de 13,78 cm (valor p 0.05), al compararlo con los valores del control (15.03 cm).

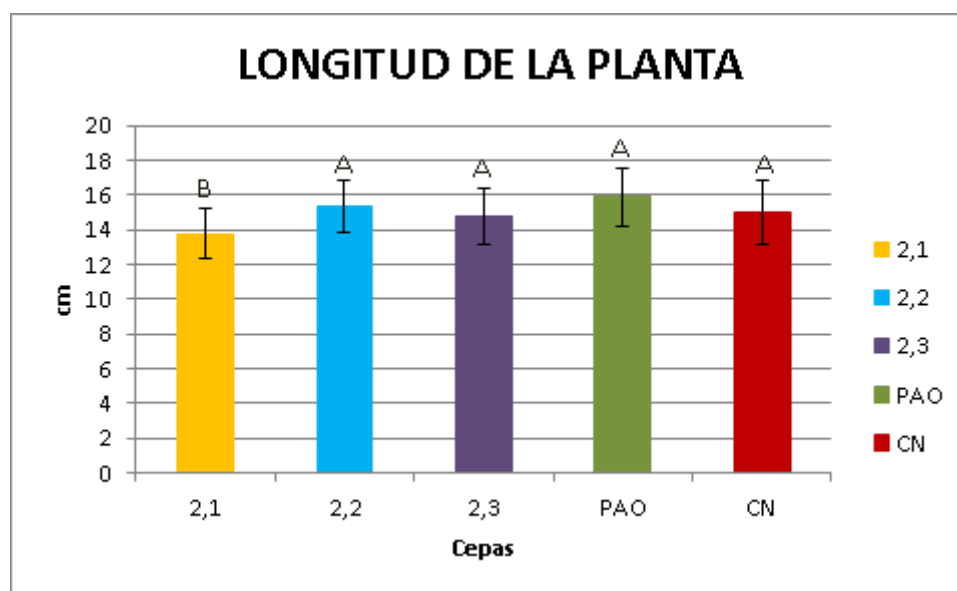


Figura 12. Longitud total de las plantas de tomate.

Al realizar el conteo del número de hojas, se evidenció que no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la cepa 2.1 y 2.2 frente al control, a excepción de la cepa 2.3 (7,44) que tuvo mayor promedio de hojas respecto a las plántulas que no tuvieron tratamiento (6.93, valor p 0,049) (figura 13).

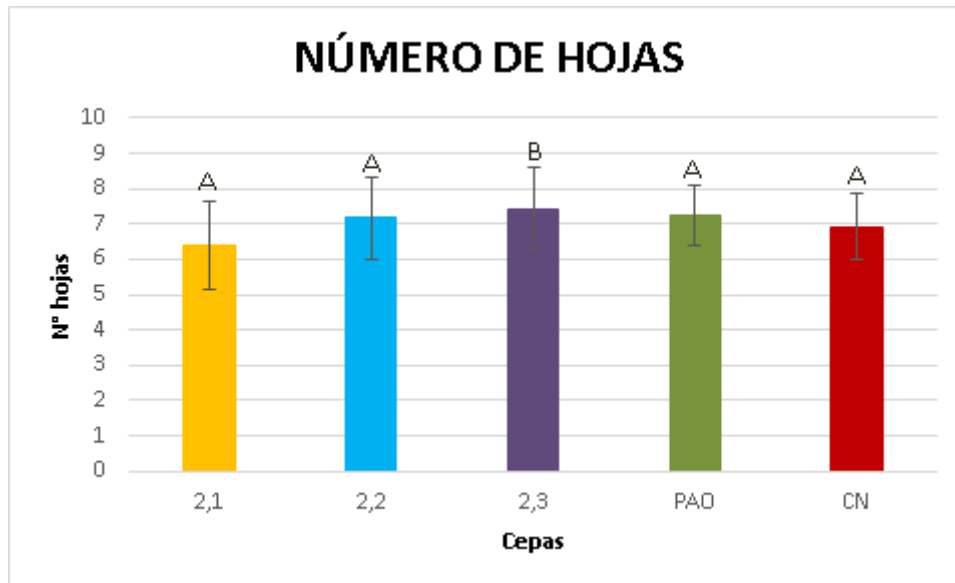


Figura 13. Número de hojas de las plantas de tomate.

4.4 Amplificación del gen 16S

Aunque las cepas que fueron donadas desde México estaban caracterizadas a nivel genético como *Pseudomonas* spp, se decidió por un lado realizar extracción de DNA genómico y a partir de éste amplificar el gen 16S ribosomal para confirmar la caracterización, y por otro se quería amplificar algunos de los genes de los metabolitos probados, para confirmarlos a nivel genético, pero por tiempo, solo se amplificó 16S ribosomal. En la figura 14, se evidencia en gel de agarosa al 1% la presencia de dicho gen en cada una de las cepas de *Pseudomonas* psicrofílas.

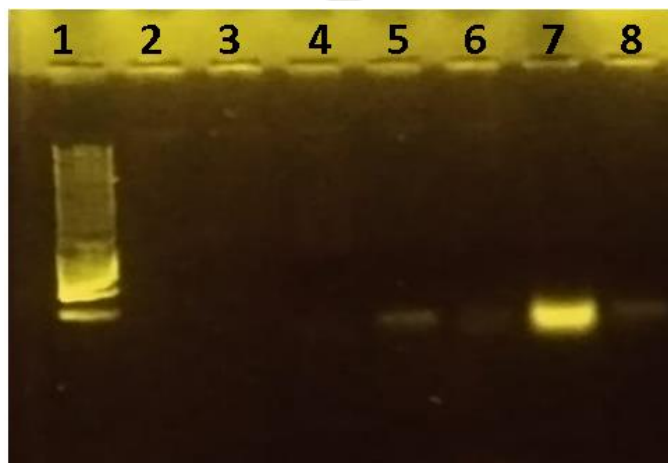


Figura 14. Electroforesis del gen 16S. Pozo 1: MP 1 kb. Pozo 4: con control negativo. Pozo 5: control positivo (*Pseudomonas aeruginosa*). Pozo 6 a 8: cepas 2.1, 2.2 y 2.3.

5. Discusión

Se conocen bacterias asociadas a las plantas que promueven el crecimiento vegetal (PGPM), estas tienen la capacidad de colonizar el sistema radicular o el entorno más cercano de la planta, pudiendo ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos²⁴, su importancia radica en que son una alternativa para evitar el impacto medioambiental que causan los fertilizantes químicos, en este proyecto demuestran que las cepas analizadas tienen la capacidad de producir algunos de los mecanismos que promueven el crecimiento vegetal, como la producción de AIA y amonio, solubilizan fosfatos, y pueden fijar nitrógeno atmosférico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la investigación de Balcazar et al. 2015²⁹ que en glaciares se han aislado microorganismos psicrófilos, y varios factores promotores de crecimiento vegetal fueron identificadas en estas bacterias, mostrando su potencial en la agricultura.

Según Vega et al. 2016³², las auxinas son fitohormonas que juegan el rol más importante en el desarrollo de las plantas y que para su biosíntesis el precursor principal es el triptófano; ellos determinaron la capacidad de *Pseudomonas putida* para sintetizar AIA, al igual que en la investigación realizada por Meliani et al. 2017⁸ donde identificaron que *P. putida* y *P. fluoerescens* tienen la capacidad de sintetizar AIA con una producción de 166 µg/ml y 89



$\mu\text{g/ml}$ respectivamente, resultados que coinciden con los obtenidos en nuestro estudio de las cepas psicrófilas de *Pseudomonas* spp. 2.1 (574.4 $\mu\text{g/ml}$), 2.2 (44.9 $\mu\text{g/ml}$) y 2.3 (233.7 $\mu\text{g/ml}$), demostrando que diversas especies de *Pseudomonas* de diferentes ambientes (ambientes extremos) tienen la capacidad de sintetizar AIA.

Los microorganismos cumplen la importante función de mantener el equilibrio de los agroecosistemas mediante la realización de los ciclos biogeoquímicos. Entre los grupos funcionales se encuentran las bacterias solubilizadoras de fosfatos que le permiten a las plantas absorber el fosfato que ya han solubilizado³³. Según Beltrán et al. 2014³³ y Patiño et al. 2014⁴¹, el género *Pseudomonas* spp. se encuentra dentro de los géneros de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), utilizando como mecanismo la disminución del pH para poder realizar la solubilización por medio de la producción de ácido glucónico; concordando con las reacciones obtenidas en la prueba cualitativa en el medio SRS, que se evidenció por formación de un halo de acidificación, y formación de un halo de solubilización claro alrededor de la colonia; igualmente sucedió en la prueba cuantitativa por la acidificación del medio NBRIP que inicialmente se encontraba con un pH de 7. Los resultados de la investigación de Balcazar et al. 2015²⁹, describieron que diferentes cepas de *Pseudomonas* psicrófilas: *P. orientalis*, *P. brenneri*, *P. monas brenneri*, *P.* y *P. antarctica* produjeron disminución del pH del medio, al solubilizar fosfatos (valores que bajaron de pH 7 a 3.68) y la concentración de fosfato soluble estuvo entre 142.7 a 98.4 mg/L, demostrando que los resultados obtenidos de las cepas en estudio 2.1 (pH 3.86- concentración de fosfato de 81,6 mg/L), la cepa 2.2 (pH de 3,46 - concentración de fosfato de 199,6 mg/L) y la cepa 2.3 (pH de 4.12 - concentración de fosfato de 118 mg/L) se relacionan con la característica de algunas especies de *Pseudomonas* spp. que solubilizan fosfatos.

El nitrógeno es uno de los constituyentes más importantes de las proteínas, sin embargo es un factor limitante para las plantas, por ello, los microorganismos diazótrofos son necesarios para cumplir el rol de fijar el nitrógeno atmosférico²¹. En la investigación realizada por Kifle and Laing 2016⁷ nombran que entre las bacterias diazotróficas asociadas al maíz se encuentra la *Pseudomonas nitroreducens*, ellos evaluaron la capacidad de *P. nitroreducens* para fijar nitrógeno en medio semisólido libre de nitrógeno. Otro estudio realizado por Suyal et al.



2017⁹, demostró la capacidad de *P. jessenii* de crecer en medio Burk que también es carente de nitrógeno y amplificó el gen *nif* en dicha cepa, ya que por lo general se usa como biomarcador en la identificación de diazótrofos, además, resaltó que hay muy pocos informes sobre respuestas adaptativas de las bacterias a bajas temperaturas. Respecto a las investigaciones anteriormente nombradas, se evidencia que algunas cepas psicrófilas de *Pseudomonas spp.* tienen la capacidad de fijar nitrógeno, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en nuestro estudio con las *Pseudomonas* psicrófilas, ya que la cepa 2.2 pudo crecer en medio NF, y ser considerada como diazótropa.

El ciclo de nitrógeno inicia con la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, el cual es asimilado por las plantas ayudándoles en su desarrollo y su nutrición, esto quiere decir que es un factor de promoción de crecimiento. En la investigación de Goswami et al. 2013⁴, se analizó una cepa psicrófila del género *Pseudomona spp.*, a la cual se le cuantificó la producción de amonio a partir de agua peptonada, obteniendo como resultado una concentración máxima de 0.32 mg/L; al compararlo con los resultados obtenidos de las cepas psicrófilas de *Pseudomonas spp.* en este estudio, que también se cuantificaron a partir de agua peptonada y teniendo en cuenta que el control positivo que se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* que tuvo como resultado 0,25 mg/L en la producción de amonio; la cepa 2.1 (0,07 mg/L), y la cepa 2,3 (0,05 mg/L) mostraron baja producción de amonio, a diferencia de la cepa 2,2 (0,21 mg/L) que tuvo una mayor producción de amonio, resultado similar al que se obtuvo de la cepa PAO.

Según la revisión realizada por Cardozo y Quiriban 2014³⁶, el género *Pseudomonas* se caracteriza por ser catalasa positivo, y utilizan estas enzimas como mecanismo para detoxificar especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés), y en las plantas es de suma importancia este mecanismo ya que si no estuviera presente afectaría proteínas sensibles al sistema redox. En otra revisión realizada por Nadeem et al 2013⁴² mencionan que *Pseudomonas fluorescens* incrementó el crecimiento de la planta *Catharranthus roseus* a pesar de haber estado sometida en condiciones de estrés salino, condición que potencializa la concentración de ROS. Lo anterior, también se refleja en la investigación realizada por Cerqueira et al. 2013⁴³ en la que resaltan que el estrés oxidativo genera ROS en las plantas,



como oxígeno atmosférico, radicales hidroxilo y anión superóxido, generando daños en los lípidos, proteínas y otros componentes celulares; en la metodología de dicha investigación se sometieron unas plantas de caupí a estrés oxidativo y se inocularon con diferentes PGPM, entre ellas una cepa de *P. graminis* y *P. durus*, como resultados obtuvieron la presencia de catalasa y su acción en plantas que fueron co-inoculadas con *Bradyrhizobium spp.* y *P. graminis* y *Bradyrhizobium spp.* y *P. durus*, y además evidenciaron que en la floración no hubo acumulación de peróxido de hidrógeno, lo que indico la acción eficaz de la actividad enzimática controlando el estrés oxidativo al que fueron inducidas las plantas. Todo lo anterior, se relaciona con los datos obtenidos en nuestra investigación con las cepas de *Pseudomonas spp*, pues todas las cepas demostraron la capacidad de catalizar el H_2O_2 y producir H_2O y O_2 .

La rizosfera es un ambiente muy complejo en la cual se encuentran una gran variedad de bacterias que deben competir por la colonización de la raíces de las plantas, para que se produzca dicha interacción se debe garantizar una correcta y eficaz colonización, la cual se lleva a cabo por medio de la movilidad, que es la habilidad de desplazarse y adherirse a la superficie, esto se lleva a cabo mediante los flagelos polares que poseen las *Pseudomonas*. Según Martín et al. 2014⁴⁴, las bacterias *P. putida* y *P. aeruginosa* poseen flagelos polares que permiten el movimiento conocido como swarming, el cual permite un movimiento rápido y coordinado impulsado por la rotación flagelar sobre superficies sólidas, además en estudios de transcriptómica, la *P. putida* durante la colonización de la rizosfera ha demostrado que el gen *fliO* que está relacionado con la síntesis del aparato de exportación flagelar al aumentar su síntesis. Lo anterior, se relaciona con los resultados obtenidos de las cepas psicrófilas de *Pseudomonas spp.* en estudio 2.1, 2.2 y 2.3 las cuales poseen un movimiento swarming en la caja de petri con agar semisólido.

Respecto al efecto de las *Pseudomonas* en la promoción de crecimiento de tomate, los resultados mostraron que en general las cepas probadas no tuvieron un efecto positivo frente al control sin inocular, sin embargo mostraron su capacidad para producir algunos de los metabolitos promotores de crecimiento que se conocen en la actualidad. Frente a las variables de peso fresco de raíz y tallo, que estuvieron en un promedio de 0,02 y 0.16 g



respectivamente, estos datos se correlacionan con los obtenidos por Sánchez et al. 2012⁵, donde evaluaron diferentes variables en plántulas de tomate (variedad Sofía) que fueron tratadas con inóculos de diferentes microorganismos, entre las variables estaba el peso seco de la raíz y de la parte aérea, y la longitud de la planta, se determinaron al día 30, 60 y 90, se evidenció que el peso seco de la parte aérea de la planta con el inóculo de las *Pseudomonas spp.*, generaron una diferencia frente al testigo al día 90. En otra investigación propuesta por V. Gravel et al. 2007⁴⁵ evaluaron cinco bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *P. fluorescens* subgrupo G, *P. marginalis*, *P. putida* subgrupo B y *P. syringae*; demostrando tener un efecto promotor sobre el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*), debido a la producción de AIA y a la presencia de triptófano, demostrando en un ensayo el aumento del peso fresco del tallo y las raíces de las plantas de tomate cultivadas a medida que se aumentaba la concentración de triptófano.

Respecto al peso seco radical, en el mismo experimento realizado por D. Sánchez et al. 2012⁵ demostraron una diferencia significativa de la raíz que tuvo tratamiento con *Pseudomonas putida*, presentando diferencia estadísticamente significativa frente al testigo absoluto y también frente al testigo químico superando el peso con un 10% de diferencia; en los resultados obtenidos con las cepas psicrófilas no se evidenciaron diferencias significativas, pues las cepas en estudio y el control PAO tuvieron un peso seco de la raíz de 0.02 g, y el control negativo tuvo un peso de 0.001 g, estos datos se pueden deber al poco tiempo en que se realizó el experimento, a los nutrientes obtenidos o a la capacidad de las plantas de adquirir los nutrientes del suelo⁵, ya que varios estudios han demostrado que la presencia de ácido-3-indolacético genera un gran impacto en el desarrollo radicular de las plantas, y que se conoce al género *Pseudomonas spp.* por tener potencial al producir dicha fitohormona y por ende estimular el crecimiento de las plantas.

Los resultados obtenidos de la longitud de las plantas que tuvieron tratamiento con las *Pseudomonas* psicrófilas oscilaban entre 13.78 cm y 14.74 cm, destacando la cepa 2.2 con una mayor longitud de 15.35 cm y la 2.3 con 14.74 cm que evidenció una diferencia significativamente negativa frente al control, lo anterior se relaciona con la investigación de D. Sánchez, que al determinar la longitud de la planta observó que al día 30 y 60 no



evidenciaron diferencia significativa en las plantas inoculadas con especies de *Pseudomonas*, solo al día 90, donde observó que en las plantas inoculadas con *Pseudomonas putida* habían ejercido el efecto, casi triplicando la medida con respecto al testigo absoluto y evidenciando un 30% de diferencia frente al testigo químico.

Los microorganismos evaluados en este estudio no tuvieron efecto significativamente positivo sobre las variables analizadas en las plantas de tomate, estos resultados se pueden atribuir a diferentes variables como las condiciones a las que las plántulas estuvieron sometidas, puede afectar la concentración del inóculo, el tiempo de contacto de las semillas con las bacterias o al tiempo en el que se determinaron las variables, posiblemente si se hubiera prolongado el tiempo se hubieran podido observar diferencias estadísticamente significativas. Además, es importante resaltar que no hay suficientes estudios que demuestran el efecto de *Pseudomonas* psicrófilas en la promoción de crecimiento vegetal en plantas de tomate.

6. Conclusiones

1. El empleo de bacterias en la promoción de crecimiento vegetal es una alternativa que impacta a nivel medioambiental y económico, pues disminuye el uso de agentes químicos que generan compuestos tóxicos y reduce gastos en cuanto al suministro de factores promotores de crecimiento vegetal.
2. Son pocos los estudios de promoción de crecimiento vegetal que se han realizado en bacterias psicrófilas, por ello este proyecto promueve la innovación con el empleo de microorganismos extremófilos como biofertilizantes.
3. La acción de las PGPM en las plantas es importante debido a que las bacterias



cumplen la función de solubilizar y de metabolizar compuestos que no pueden ser asimilados por las plantas.

4. La cepa que produjo mayores factores promotores de crecimiento vegetal fue la *Pseudomonas* spp. psicrófila 2.2. La única cepa fijadora de nitrógeno, también produjo AIA, amonio, solubilizó fosfatos, tiene presencia de la enzima catalasa y motilidad.
5. Se evidenció que las pruebas cualitativas no son tan sensibles como las cuantitativas, pues se observa que en la prueba de producción de AIA todas las cepas en la prueba cualitativa arrojaron un resultado negativo, caso contrario sucedió en la prueba cuantitativa ya que se evidenció producción de dicha fitohormona.
6. Respecto al efecto de las cepas de *Pseudomonas* psicrófilas en la promoción de crecimiento de tomate, los resultados mostraron que en general las cepas probadas no tuvieron un efecto positivo frente al control sin inocular, sin embargo, mostraron su capacidad para producir algunos de los metabolitos promotores de crecimiento que se conocen en la actualidad.
7. La cepa que mejor promovió la germinación de las plántulas fue la cepa 2.2 con un porcentaje de 95%.

7. Recomendaciones

Para próximas investigaciones, se recomienda extender el tiempo del ensayo de la promoción de crecimiento vegetal en las plantas de tomate, un tiempo mayor a los 30 días puede demostrar diferencias significativas, igualmente se podría someter el ensayo a bajas temperaturas para poder demostrar si en esas condiciones las bacterias potencializan el



crecimiento vegetal y si representa alguna protección de la planta sometiendo a dichas condiciones, debido a que son microorganismos psicrófilos. Igualmente, al haber demostrado que la cepa 2.2 generó resultados positivos en cada uno de los ensayos *in vitro* se podría secuenciar para identificar la especie de *Pseudomonas*.

8. Referencias bibliográficas



1. Savci S. An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*. 2012;3(1):73.
2. González H, Fuentes N. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. 2015.
3. Parani K, Saha B. Prospects of Using Phosphate Solubilizing *Pseudomonas* as Bio Fertilizer. *Eur. J. Biol. Sci.* 2012;4
4. Goswami D., Vaghela H., Parmar S., et al. Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas spp.* strain OG isolated from marine water. *Journal of Plant Interactions*. 2013; 8:4, 281-290.
5. Sánchez D., Gómez R. et al. Inoculation with plant growth promoting bacteria on tomato under greenhouse conditions. *Laboratorio de Microbiología de Suelos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA)*. 2012;3,7.
6. Kifle M., Laing M. Isolation and Screening of Bacteria for Their Diazotrophic Potential and Their Influence on Growth Promotion of Maize Seedlings in Greenhouses. *Discipline of Plant Pathology, School of Agricultural, Earth and Environmental Sciences University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa*. 2015.
7. A. Meliani, A. Bensoltane, L. Benidire, K. Oufdou. Plant Growth-Promotion and IAA Secretion With *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Laboratory of Research of Biological Systems and Geomatic, Department of Biology, Faculty of Science, University Mascara, Algeria*. 2017.
8. Suyal D., et al. Cold Stress and Nitrogen Deficiency Affected Protein Expression of Psychrotrophic *Dyadobacter psychrophilus* B2 and *Pseudomonas jessenii* MP1. *Department of Microbiology, College of Basic Sciences and Humanities, G. B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, India*. 2017.
9. Win KT, Fukuyo T, Keiki O, Ohwaki Y. The ACC deaminase expressing endophyte *Pseudomonas spp.* Enhances NaCl stress tolerance by reducing stress-related ethylene production, resulting in improved growth, photosynthetic performance, and ionic balance in tomato plants. *Plant Physiol Biochem*. 2018;127:599-607.



10. Classification USDA PLANTS [Internet]. Plants.usda.gov. 2018. Disponible en: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=SOLY2>
11. Manual tomate. Cámara de comercio Bogotá 2015.
12. Guzmán A, et. al. Manual de cultivo del tomate al aire libre. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 2017.
13. Lombardo J. Aptitud de cuatro cultivares de Tomate Cherry para su cultivo en Invernadero de La Costa de Granada. Universidad de Almeria. 2017.
14. Fandiño G., Moreno J. Manejo integrado de la mosca blanca (homóptera: *Aleyrodidae*) en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de invernadero. Universidad distrital Francisco José de caldas. Bogotá D.C. 2016.
15. Ernesto M. Mancha Gris de la Hoja del Tomate: Identificación, Biología y Genómica del Agente Etiológico. Universidad Nacional de La Plata. Argentina; 2019.
16. Axayacatl O, Osorio G, Axayacatl O. Estadísticas agrícolas de tomate: producción, superficie y rendimiento. 2019.
17. Cardona A. Antioquia y Norte de Santander son los departamentos líderes en la producción de tomate. La República. 2018.
18. Burbano E., Vallejo C. Producción de líneas de tomate “chonto”, *Solanum lycopersicum mill.*, con expresión del gen *sp* responsable del crecimiento determinado. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 2017;11(1):63-71.
19. Manrique L. Nueva esperanza para volver a exportar tomate colombiano. UN periódico digital. 2018.
20. Fao.org. Los fertilizantes y su uso. 2018.
21. Boschini-Figueroa C, Vargas-Rodríguez CF. Composición nutricional del tripsacum laxum fertilizado con nitrógeno, fósforo y potasio. *Agronomía Mesoamericana*. 2018;29(1):141. doi: 10.15517/ma.v29i1.27293.
22. Flórez C., Buono S., Giorgini S. Guía de consulta Enfermedades de Tomate. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2012.
23. Savci S. An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development* 2012;3(1):73-80.



24. Kaymak DC. Potential of PGPR in agricultural innovations. In: Maheshwari DK, editor. Plant growth and health promoting bacteria. Berlin Heidelberg, Germany: Springer- Verlag; 2010.
25. Peix A, Ramírez-Bahena M, Velázquez E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. 2018.
26. Palleroni N. *Pseudomonas*. Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria.
27. Oliart R, Manresa A, Sánchez M. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. 2016.
28. Díaz A., Estrada M. Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos. Universidad técnica de Ambato. 2018.
29. Balcazar W, Rondón J, Rengifo M, Ball MM, Melfo A, Gómez W, Yarzabal LA. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiol Res.* 2015;177:1-7.
30. 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. *Biol Fertil Soils.* 2005;42:97–108
31. D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep.* 2006;7:385–389.
32. Vega P., Canchignia H., González M., Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales.* 2016; 37:33-39.
33. Beltrán E. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 2014;15(1):101-113.
34. Souza R, Ambrosini A, Passaglia L. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils, *SciELO.* 2015; 38:4.
35. Calvo S.. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Dialnet.* 2011; 173- 186.
36. Cardozo P., Quiriban A. Proteins in water stress tolerance in plants. *Semiarida. Facultad de Agronomía.* 2014; 24(1):55-67.



37. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9^a ed. Buenos Aires: Editorial médica Panamericana; 2007. p. 81- 83.
38. Scharf B, Hynes M, Alexandre G. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations. *Plant Molecular Biology*. 2016; 90(6):549-59.
39. Malik D, Sindhu S. Transposon-derived mutants of *Pseudomonas* strains altered in indole acetic acid production: Effect on nodulation and plant growth in green gram (*Vigna radiata L.*). *Physiol Mol Biol Plants*. 2008; 14(4): 315–320.
40. Villota C. Evaluación del potencial de promoción del crecimiento vegetal de microorganismos aislados a partir de residuos de higuera (*Ricinus communis*), en zanahoria (*Daucus carota*). Universidad Católica de Manizales. Instituto de investigación en microbiología y biotecnología agroindustrial. 2013.
41. Patiño C., Sanclemente O. Los microorganismos solubilizadores de fosforo (MSF): Una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. Universidad libre de Cali. *Ciencias Agrícolas*. 2014; vol. 10 No.2.
42. Nadeem S., et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. Elsevier. 2013;429-448.
43. Cerqueira A., Bonifacio A., et al. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the interrelationship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. Soil Science Graduate Program, Federal Agricultural University of Pernambuco, Agronomy Department, UFRPE/DEPA. Recife, Pernambuco, Brazil. 2013; 245- 251.
44. Martín M., Martínez F., Rivilla R. Colonización de la rizosfera por *Pseudomonas*. Universidad Autónoma de Madrid. 2014.
45. Gabriel V., Antoun H., et al. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Centre de recherche en horticulture, Université Laval. 2007.



ANEXO 1. PREPARACIÓN MEDIO SRS

Utilizado para la valoración de la eficiencia relativa de solubilización de los aislamientos, empleando el método propuesto por Sundara Rao y Sinha (1963) sobre el medio SRS, basado en la medición del diámetro de halos de transparencia alrededor de colonias bacterianas que crecen en un medio de cultivo sin formas solubles de PO_4^{3-} pero con fosfato de calcio o hierro, el cual puede ser solubilizado por bacterias que presenten esta capacidad. La eficiencia relativa de solubilización de fosfatos se expresa haciendo una relación del diámetro del halo de solubilización con respecto al diámetro de la colonia.

Para cuantificación y aislamiento de colonias solubilizadoras de fosfatos.

Componentes g/L:

COMPONENTES	g/ L
$(NH_4)_2 SO_4$	0.5



KCl	0.2
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0.3
Mn SO ₄ . H ₂ O	0.004
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	0.002
NaCl	0.2
Extracto de levadura	0.5
Púrpura de Bromocresol	0.1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0
Agar	18.0

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

ANEXO 2. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATO.

Esta evaluación se realizó por duplicado para cada bacteria utilizando la prueba analítica Spectroquant® Test fosfatos (Merck®), cuyo principio se fundamenta en el método del azul molibdeno sugerido por Chen et al. (2006); siendo un procedimiento análogo al US Standart methods 4500-P (APHA, 2012) adaptado a las condiciones del ensayo. De cada aislado se realizó un cultivo en 10 mL de caldo nutritivo (Oxoid ®) con incubación a 28 °C durante 24 horas, luego se tomó 1 mL del mismo y se centrifugó a 7000 rpm/5 minutos, se retiró el sobrenadante y se llevó la suspensión bacteriana con solución salina estéril al 0,85 % a DO de 1 a 541 nm. Se tomaron alícuotas de 100 µL a partir de dicha suspensión, se inocularon en 50



mL del medio de cultivo NBRIP líquido (sin agar bacteriológico) y fueron incubadas durante 14 días a 28 °C según Nautiyal (et al., 1999) y Kadiri et al. (2013).

Al final del proceso de incubación se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm/5 minutos para poder medir el pH final del medio de cultivo (Charakborty et al., 2010) y se tomaron alícuotas de 5 mL del sobrenadante con el fin de realizar la prueba colorimétrica para la determinación de ortofosfatos, se realizó la lectura en espectrofotómetro a 690 nm y se detectó la concentración de fosfato soluble en mg/L.

Preparación del medio de cultivo selectivo NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate growth médium) en g/L:

COMPONENTES	g/ L
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5



$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,1
KCl	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5
Agar (Ajustar pH 7)	14

Referencia

Beltrán M. Bacterias solubilizadoras de fosfato con potencial biofertilizante en suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum*). Agronomía. Grupo de investigación Gestión ambiental, Universidad de Boyacá, Tunja, Boyacá. 22(2): 7 - 20, 2014.



ANEXO 3. INSERTO KIT SPECTROQUANT FOSFATOS

1.14842.0001

Spectroquant® Test Fosfatos

P

para determinación de ortofosfatos

1. Método

En solución sulfúrica los iones ortofosfato forman con vanadato amónico y heptamolibdato amónico ácido molibdato vanadato fosfórico de color amarillo anaranjado que se determina fotométricamente (método "VM").
El procedimiento es análogo a APHA 4500-P C.

2. Intervalo de medida y número de determinaciones

Cubeta mm	Intervalo de medida			Número de determinaciones
	mg/l de PO ₄ -P ⁴⁺	mg/l de PO ₄ ³⁻	mg/l de P ₂ O ₅	
20	0,5 - 15,0	1,5 - 46,0	1,1 - 34,4	400
10	1,0 - 30,0	3,1 - 92,0	2,3 - 68,7	

⁴⁺P de fosfato

Datos de programación para determinados fotómetros / espectrofotómetros, ver www.service-test-kits.com.

3. Campo de aplicaciones

El test determina solamente ortofosfatos.

Material de las muestras:

Aguas subterráneas y superficiales, agua de mar
Aguas residuales
Aguas industriales
Agua de calderas
Soluciones nutritivas para fertilización
Suelos tras preparación apropiada de la muestra

4. Influencia de sustancias extrañas

Ésta se comprobó de forma individual en soluciones con 15 y con 0 mg/l de PO₄-P. Hasta las concentraciones de sustancias extrañas indicadas en la tabla la determinación todavía no es interferida. No se han controlado efectos cumulativos; sin embargo, éstos no pueden ser excluidos.

Concentración de sustancias extrañas en mg/l o en %							
AsO ₄ ³⁻	50	Ca ²⁺	1000	Ni ²⁺	100	NaCl	20 %
Ca ²⁺	1000	Fe ³⁺	10	NO ₂ ⁻	1000	NaNO ₂	20 %
Co ²⁺	1000	Hg ²⁺	1000	Pb ²⁺	10	Na ₂ SO ₄	20 %
CN	1000	Hg ²⁺	1000	S ²⁻	10		
Cr ⁶⁺	50	Hs ²⁺	1000	SiO ₄ ⁴⁻	100		
CrO ₄ ²⁻	5	NH ₄ ⁺	1000	Zn ²⁺	1000		

5. Reactivos y auxiliares

¡Tener en cuenta las advertencias de peligro que se encuentran en los diferentes componentes del envase!

El reactivo del test es utilizable hasta la fecha indicada en el envase si se conserva cerrado entre +15 y +25 °C.

Contenido del envase:

1 frasco de reactivo PQ₄-1
1 AutoSelector

Otros reactivos y accesorios:

MQuant® Test Fosfatos, art. 110428,
intervalo de medida 10 - 500 mg/l de PO₄³⁻ (3,3 - 16,3 mg/l de PO₄-P)
MQuant® Tiras indicadoras universales pH 0 - 14, art. 109535
Ácido sulfúrico 0,5 mol/l Tibipur®, art. 109072
Fosfatos - solución patrón Certipur®, 1000 mg/l de PO₄³⁻, art. 119898
Ácido clorhídrico 25 % para análisis EMSURE®, art. 100316

Pipetas para volúmenes de pipeteo de 1,2 y de 5,0 ml
Cubetas rectangulares 10 y 20 mm (2 unidades de cada tipo),
art. 114946 y 114947

6. Preparación

- Enjuagar el material de vidrio solamente con detergentes exentos de fosfatos. En otro caso dejarlo llenado con ácido clorhídrico (aprox. 10 %) durante varias horas.
- Analizar las muestras inmediatamente después de la toma de muestras.
- Comprobar el contenido de fosfatos con el test Fosfatos MQuant®. Las muestras con más de 30,0 mg/l de PO₄-P deben diluirse con agua destilada.
- El valor del pH debe encontrarse en el intervalo 0 - 10. Si es necesario, ajustar con ácido sulfúrico.
- Filtrar las muestras turbias.

7. Técnica

Muestra preparada (10 - 40 °C)	5,0 ml	Pipetear en un tubo de ensayo.
Reactivo PQ ₄ -1	1,2 ml	Añadir con pipeta y mezclar.
Introducir la muestra de medición en la cubeta y medir en el fotómetro.		

Notas sobre la medición:

- **Ciertos fotómetros exigen una muestra en blanco** (preparación como la muestra de medición, pero con agua destilada en lugar de la muestra).
- Para la medición fotométrica las cubetas deben estar limpias. Si es necesario, limpiarlas con un paño seco y limpio.
- Las turbideces después de acabada la reacción dan como resultado valores falsamente elevados.
- El valor del pH de la solución de medición debe encontrarse en el intervalo 0,5 - 1,0.
- El color de la solución de medición permanece estable como mínimo 60 minutos.

8. Aseguramiento analítico de la calidad

se recomienda antes de cada serie de mediciones
Para comprobar el sistema fotométrico de medición (reactivos del test, dispositivo de medición, manipulación) y el modo de trabajo puede usarse una solución patrón de fosfatos diluida de 15,0 mg/l de PO₄-P (46,0 mg/l de PO₄³⁻).

Mediante adición de patrón se pueden determinar las interferencias dependientes de la muestra (efectos de matriz).

Notas adicionales, ver bajo www.qa-test-kits.com.
Certificados de calidad y lobe para Kits de test de Spectroquant®, véase el sitio web. Allí se indican todos los datos del control de producción que se han obtenido según ISO 8466-1 y DIN 38402 A51.

9. Notas

- Cerrar de nuevo inmediatamente el frasco tras la toma del reactivo.
- **Podrá pedirse información sobre los procedimientos de eliminación en www.dieposal-test-kits.com.**

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.analytical-test-kits.com
EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive
Burlington MA 01803, USA, Tel. +1-978-715-4321





ANEXO 4. MEDIO NF (LIBRE DE NITRÓGENO) SEMISÓLIDO

Protocolo según Medhin H. Kifle and Mark D. Laing 2016

Protocolo modificado de Döbereiner (1988) (medio semisólido libre de Nitrógeno) para aislar bacterias diazotróficas. Se siembra un preinóculo en caldo LB por dos días a 22°C y se siembra en medio NF que se compone:

COMPONENTES	g/ L
mannitol, sucrose, or malate as the carbón source	20 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
NaCl	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
K ₂ SO ₄	0.1 g
CaCO ₃	5.0 g
Agar (for semi-solid media)	5 g



Se incubó a temperatura ambiente por ocho días y se procede a observar si crecieron o no las cepas. Si hay crecimiento quiere decir que son bacterias fijadoras de nitrógeno.

Referencia

Kifle M. y Laing M. Isolation and Screening of Bacteria for Their Diazotrophic Potential and Their Influence on Growth Promotion of Maize Seedlings in Greenhouses. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1225; 2015.

ANEXO 5. PRODUCCIÓN DE AMONIO

Protocolo según Ahmad et al. 2008.

Se realizó un preinóculo en caldo LB por dos días a temperatura de 22°C, se procedió a centrifugar por 5.0 min a 7000 rpm, se ajusta inóculo a 1 DO y se siembra en agua peptonada por tres días a 22°C y se procede a leer con kit de Amonio (spectroquant).

ANEXO 6. PREPARACIÓN DE MEDIO SEMISÓLIDO

MOTILIDAD SWARMING

Protocolo según Boyer 2008, con modificaciones

Para que un medio de cultivo sea sólido significa que en 1 litro de agua destilada hay 15g de agar-agar en su composición lo que indica a su vez que el medio está a una concentración de agar del 1,5%, explicando:

15 g de agar-agar ----- 1,5% concentración

X ----- 0,85% concentración

X= 8,5 g de agar-agar para un litro de agua destilada



Ahora bien, para que sea un agar nutritivo semisólido, es importante agregar los componentes para que haya un óptimo crecimiento bacteriano y debe ser suplementado con Caldo nutritivo, usando la cantidad que indique la etiqueta.

8g de caldo nutritivo para un litro de agua destilada.

EJEMPLO:

Preparar 200 ml de agar nutritivo semisólido.

8,5 g de agar-agar ----- 1000 ml H₂O_d

X ----- 200 ml H₂O_d X

X= 1,7 g de agar-agar

8g de caldo nutritivo ----- 1000 ml H₂O_d

X ----- 200 ml H₂O_d

X= 1,6 g de caldo nutritivo

Para esto se debe tomar un Erlenmeyer adicionar 200ml de H₂O_d y allí mismo agregar los 1,7 g de agar-agar más los 1,6 g de caldo nutritivo, sellar con papel aluminio, esterilizar a 121°C.

Referencia

Boyer, Mickaël, et al. A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Research in microbiology*. 2008;159, 699-708.



ANEXO 7. PROTOCOLO DE SIEMBRA DE SEMILLAS DE TOMATE CHONTO

Materiales

- Vasos plásticos de 12 onzas con agujeros por debajo
- Portavasos desechables
- Suelo
- Turba
- Germinadores
- Pinzas estériles
- Breaket
- Mechero
- Agua destilada estéril
- Jeringa de 10ml
- Bolsas de aluminio
- Semillas de tomate chonto
- Falcón de 50 ml estériles
- Hipoclorito de sodio al 3%
- Alcohol 70%
- Solución Hoagland

DIA 1.



1. Preparación y esterilización de 100 ml de caldo nutritivo
2. Esterilización de la turba en bolsas de aluminio
3. Dispensación de 5 ml de caldo nutritivo en tubos tapa rosca
4. Inoculación de cepas 2.1, 2.2, 2.3 y PAO en cada tubo
5. Incubación, la cepa de control PAO se incubó a 37°C por 24 horas y las cepas 2.1, 2.2 y 2.3 a 22°C por 48 horas a 200 rpm.



DIA 3.

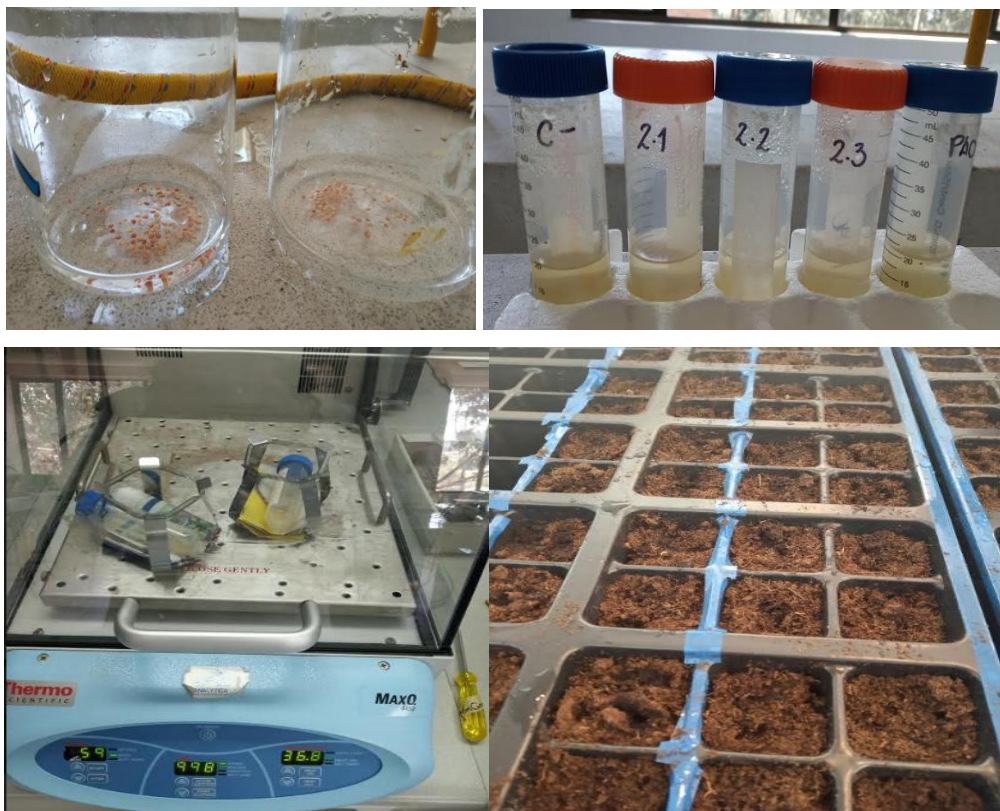
1. Centrifugación de las cepas para obtener el pellet y disolver con agua destilada
2. Transferencia de 50 μ l de la biomasa en tubos falcon que contienen 17 ml de caldo nutritivo
3. Ajuste de los inóculos a una densidad óptica de 0.160 en una longitud de onda de 546 nm.
4. Esterilización de agua destilada en una fiola con capacidad de 1L
5. Esterilización de pinzas metálicas
6. Esterilización de beakers para desinfectar las semillas

DIA 4.

1. Desinfección de semillas de tomate chonto con un lavado de hipoclorito de sodio 3% durante 5 minutos, luego se realizan tres lavados con agua estéril, posteriormente con alcohol 70% durante 5 minutos y por último se lavan tres veces con agua destilada.
2. Distribuir las semillas en cada tubo Falcon que contiene 17 ml de caldo inoculado con cada cepa de *Pseudomonas* spp y con el control positivo (*Pseudomonas aeruginosa*).
3. Mantener en agitación el medio con las semillas durante 2 horas.



4. Agregar turba en los germinadores hasta la mitad de los pozos, y con pinza estéril poner de a una semilla por pozo, al finalizar cubrir las semillas con otra capa de turba.
5. Agregar 4 ml de agua con solución Hoagland en cada uno de los pozos sembrados.



DIA 18.

1. Se debe esterilizar 2 veces el suelo a utilizar en la siembra

DIA 19.

1. Llenar $\frac{1}{3}$ de los vasos plásticos con suelo estéril
2. Transferencia de las plántulas que crecieron en turba a los vasos con suelo estéril
3. Agregar otra capa de suelo que tape la raíz de la plántula
4. Dispensar agua con solución Hoagland en los portavasos desechables, y sobre éste poner los vasos sembrados





ANEXO 8. PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE VARIABLES EN LAS PLANTAS DE TOMATE

Luego de haber sembrado las semillas en los germinadores con turba, se observa la germinación a los 8 días posterior a su siembra.

Las plántulas se trasvasan 15 días después de haber sembrado las semillas, y a partir de ese día se debe contabilizar un mes para que crezcan las primeras hojas verdaderas y poder realizar las mediciones en las plantas. Se debe determinar el peso fresco y el peso seco, el número de hojas, la longitud de la planta, de la raíz y del tallo.

1. Sacar cuidadosamente las plantas del vaso ya que las raíces son muy delgadas.
2. Separar la tierra que se encuentra en parte del tallo y raíz de la planta, si es necesario, hacer lavados con agua de chorro.
3. Poner las plantas sobre una toalla de papel para que se absorba el agua.
4. Medir con una regla la longitud de cada planta.
5. Realizar un corte entre la terminación del tallo e inicio de la raíz.
6. Medir con una regla la longitud de la raíz y la longitud del tallo.
7. En una balanza pesar el peso fresco total de cada planta (raíz y tallo).
8. Luego de medir, pesar y registrar los datos, se procede a empacar cada tallo con la raíz respectiva en una bolsa de papel y rotular con la cepa correspondiente.



9. Llevar las bolsas de papel que contienen los tallos y las raíces al horno durante tres



días a 60°C.

