

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum
Lycopersicum var. Sofía*) BAJO INVERNADERO**



Pontificia Universidad Javeriana

DIANA BEATRIZ SÁNCHEZ LÓPEZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar el título de

Master en Ciencias Biológicas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ, D.C. 2011

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1996

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral Católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum
Lycopersicum var. Sofía*) BAJO INVERNADERO**



Pontificia Universidad Javeriana

DIANA BEATRIZ SÁNCHEZ LÓPEZ

APROBADO

Ruth Bonilla Buitrago Ph.D.

Director

Daniel Fernando Rojas M.Sc.

Co-director

BOGOTÁ, D.C. 2011

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum
Lycopersicum var. Sofía*) BAJO INVERNADERO**



Pontificia Universidad Javeriana

DIANA BEATRIZ SÁNCHEZ LÓPEZ

APROBADO

Fernando Valencia Ph.D

Jurado

Jimena Sánchez Ph.D

Jurado

Lucia Lozano M.Sc.

Jurado

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum
lycopersicum* var. *Sofía*) BAJO INVERNADERO**



Pontificia Universidad Javeriana

DIANA BEATRIZ SÁNCHEZ LÓPEZ

APROBADO

Ingrid Shuler
Decana Académica

Manuel A. Franco
Director Posgrado

DEDICATORIA

A DIOS POR GUIARME Y SIEMPRE ESTAR CONMIGO EN LOS MOMENTOS MAS DIFICIL.

A MI MADRE POR SIEMPRE ESTAR A MI LADO, Y BRINDARME SIEMPRE SU APOYO EN LOS MOMENTOS EN LOS CUALES QUERIA DESFALLER.

A LA MOMORIA DE MI PADRE QUE DESDE EL CIELO YO SE QUE ME CUIDAS Y ME PROTEGE.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Ruth Bonilla Buitrago por su apoyo y por permitirme realizar este trabajo de investigación en el Laboratorio de Microbiología de Suelos- Corpoica.

A Daniel Rojas por sus asesorías y paciencia en el desarrollo de esta investigación.

A María Fernanda Garrido y por colaborarme y regalarme momentos valiosos de su tiempo.

A Inés Roldan y Stella Mendieta por su apoyo y colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</i>	1
<i>1. OBJETIVOS</i>	3
1.1. Objetivo General.....	3
1.2. Objetivos específicos	3
<i>2. MARCO TEÓRICO</i>	4
2.1. Generalidades del cultivo tomate.....	4
2.2. Requerimientos climáticos del suelo.....	6
2.2.1. Temperatura.....	6
2.2.2. Humedad.....	6
2.2.3. Luminosidad	7
2.2.4. Suelos	7
2.3. Ventajas de la producción bajo invernadero	7
2.4. Valor nutricional	8
2.5. El fósforo en el suelo	9
2.6. Fertilización química	10
2.7. Mecanismo de transformación del fósforo	11
2.7.1. Mineralización del fósforo orgánico	11
2.7.2. Solubilización de fósforo	12
2.7.2.1. Producción de ácidos orgánicos	12
2.8. Sideróforos	13
2.9. Indoles totales.....	13
<i>3. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	15
3.1. Localización de la investigación.....	15

3.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	15
4. <i>METODOLOGÍA</i>	16
4.1. Caracterización fenotípica	16
4.1.1. Caracterización microscópica y macroscópica.....	16
4.2.2. Caracterización bioquímica	16
4.3. Caracterización molecular	16
4.3.1. Extracción de ADN genómico	16
4.3.2. Ampliación por PCR de la región 16S rRNA	17
4.4. Solubilización de fósforo	18
4.4.1. Análisis cualitativo de solubilización de fosfato	18
4.4.2. Análisis cuantitativo solubilización de fosfato.....	18
4.5. Estandarización del inóculo	19
4.5.1. Curva de peso seco	19
4.5.2. Cinética preliminar de crecimiento de los microorganismos.....	20
4.5.3. Actividad enzimática de la fosfatasa	20
4.6. Sideróforos e Indoles totales	21
4.6.1. Síntesis de Sideróforos	21
4.6.2. Producción Indoles totales	21
4.7. Evaluación bajo condiciones de invernadero.....	22
4.8. Análisis estadístico	24
5. <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	25
5.1. Caracterización fenotípica	25
5.1.1. Caracterización microscópica y macroscópica.....	25
5.1.2. Caracterización bioquímica	26
5.2. Caracterización molecular	26

5.3. Solubilización de Fósforo.....	27
5.3.1. Análisis cualitativo de solubilización de fosfato	27
5.3.2. Análisis Cuantitativo de Solubilización de Fosfato	29
5.4. Liberación de fósforo mediante actividad enzimática	31
5.4.2. Cinética preliminar de crecimiento de los microorganismos.....	32
5.4.3. Actividad enzimática de la fosfatasa	32
5.5. Sideróforos e Indoles totales	34
5.5.1. Síntesis de sideróforos.....	34
5.5.2. Producción de Indoles totales	36
5.7. Experimento en invernadero.....	38
5.7.1. Longitud de la planta	38
5.7.2. Peso seco de la planta	41
3.7.3. Área foliar.....	45
5.7.4. Número de flores y frutos	47
<i>Conclusiones</i>	52
<i>Recomendaciones</i>	54
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	55
<i>ANEXOS</i>	65

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición nutricional del tomate por 100 gramos de tomate fresco ...	8
Tabla 2. Ciclos y temperaturas utilizadas para la amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S por medio de PCR	17
Tabla 3. Tratamientos establecidos en el ensayo del invernadero	23
Tabla 4. Fertilización química por bolsas en gramos 100% y 50 %.....	23
Tabla 5. Análisis químico del suelo empleado en el experimento bajo condiciones de invernadero	24
Tabla 6. Descripción microscópica de las cepas bacterianas en medio SMRS-RP	25
Tabla 7. Descripción macroscópica de las cepas bacterianas en medio SMRS-RP	25
Tabla 8. Prueba bioquímica de las cepas obtenidos API 20.....	26
Tabla 9. Secuencias de las cepas con bases de datos NCBI	27
Tabla 10. Análisis cualitativo de solubilización de fosfato.....	28
Tabla 11. Análisis cuantitativo de solubilización de fosfato	30
Tabla 12. Parámetros cinéticos	32
Tabla 13. Análisis cuantitativo de Actividad enzimática.....	33
Tabla 14. Producción semi-cuantitativa de sideróforos.....	35
Tabla 15. Producción de Indoles totales.....	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Bandas observadas en el gel de agarosa al 2%.....	27
Figura 2. Altura de la parte aérea de la planta de tomate (var. Sofía).....	39
Figura 3. Longitud radical de la planta de tomate (var. Sofía).....	40
Figura 4. Peso seco de la parte aérea de planta de tomate (var. Sofía)..	44
Figura 5. Peso seco de raíz de planta de tomate (var. Sofía)..	44
Figura 6. Aérea foliar de tomate (var. Sofía).	46
Figura 7. Número de flores (var. Sofía).	49
Figura 8. Número de frutos (var. Sofía).....	50

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Composición química de la Roca Fosfórica “Fosforita de pesca”.	66
Anexo 2. Curva patrón para determinación de P soluble con técnica fosfatomoliddeno.	66
Anexo 3. Curva de peso seco Cepa TVL-1	67
Anexo 4. Curva de peso seco Cepa TVL-2.....	67
Anexo 5. Curva de peso seco cepa PSO13.....	68
Anexo 6. Curva de peso seco cepa PSO14	68
Anexo 7. Curva de peso seco cepa BEOO2	69
Anexo 8. Curva de peso seco cepa BEOO3	69
Anexo 9. Cinética preliminar de la cepa bacteriana TVL-1.....	70
Anexo 10. Cinética preliminar de la cepa bacteriana TVL-2.....	71
Anexo 11. Cinética preliminar de la cepa bacteriana PSO13.....	72
Anexo 12. Cinética preliminar de la cepa bacteriana PSO14	73
Anexo 13. Cinética preliminar de la cepa bacteriana BEOO2	74
Anexo 14. Cinética preliminar de la cepa bacteriana BEOO3	75
Anexo 15. Curva patrón de p-nitrofenil fosfato para determinación de Actividad enzimática	76
Anexo 16. Curva patrón para determinación de Indoles Totales.....	76
Anexo 17. Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S con el primer 1942R de la cepa TVL-1	77
Anexo 18. Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S con el primer 1942R de la cepa TVL-2.....	78

Resumen

El incremento en la población mundial ha aumentado la demanda de alimentos y así mismo la demanda de fertilizantes químicos los cuales no solamente son costosos sino también contaminantes. De aquí, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de varias cepas candidatas a promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento y producción del cultivo del tomate. Se emplearon las cepas TVL-1 y TVL-2 las cuales mediante secuenciación del fragmento 16S rDNA fueron identificadas como *Enterobacter sp.*, además las cepas *Pseudomonas sp.* PSO13, PSO14, y *Bacillus sp.* BEOO2 y BEOO3. Los resultados demostraron la capacidad intrínseca de las cepas para solubilizar una fuente de fósforo poco soluble donde la utilización de cepas TVL-1, TVL-2 y PSO14 evidenciaron los mejores resultados. Similarmente, las cepas TVL-1, TVL-2 y PSO13 presentaron actividad fosfatasa. Adicionalmente, las bacterias fueron capaces de producir indoles y sideróforos bajo las condiciones evaluadas. El experimento en invernadero evidenció que las cepas TVL-2 y PSO14 incrementaron de manera notoria la biomasa de la planta ($P > 0.05$) (longitud, peso seco, área foliar) así como el rendimiento en la producción de frutos lo que se puede asociar a las capacidades bioquímicas asociadas a promoción de crecimiento evaluadas en el laboratorio.

Palabras claves: Fósforo, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, Biofertilizante.

Abstract

The increment in world population has increased the demand of food and also the demand for chemical fertilizers which are not only expensive but also pollutant. Hence, the aim of this study was to evaluate the effect of the implementation of several potential strains as plant. The strains used were TVL TVL-1 and-2 which according by sequencing of 16SrDNA fragments were identified as **Enterobacter sp.**, in addition the strains PSO13, PSO14 of the genera **Pseudomonas sp.**, and BEOO2 and BEOO3 of the genera **Bacillus sp.**. Results demonstrated the inherent capacity of the strains to solubilize a poorly soluble phosphorus source where the use of the strains TVL-1, PSO14, TVL-2 and showed the best results. Similarly, the strains TVL-1, PSO13, TVL-2 showed phosphatase activity. Additionally, the bacteria were able to produce siderophores and indols under the conditions tested. The greenhouse experiment showed that the strains PSO14 and TVL-2 have significantly increased the plant biomass ($P>0.05$) (length, dry weight, leaf area) and performance in the production of fruits which can be associated with biochemical capabilities associated to promote growth assessed in the laboratory.

Key words: Phosphorus, **Enterobacter sp.**, **Pseudomonas sp.**, **Bacillus sp.**, biofertilizers.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El tomate es una de las hortalizas más difundidas en todo el mundo con el mayor valor económico, ya que representa el 30% de la producción hortícola a nivel mundial (Mejía, 2007). Su demanda aumenta considerablemente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años, se debe principalmente al rendimiento e incremento de la superficie cultivada (Jaramillo *et al.*, 2007).

El fósforo (P), es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de funciones básicas del metabolismo de las plantas (Fernández, 2007). Se trata de un componente esencial de moléculas como RNA y DNA, así como de fosfolípidos (Coney, 2000). Sin embargo, muchos suelos en todo el mundo son deficientes en P disponible para el crecimiento de las plantas. En el suelo este elemento se encuentra en forma de quelatos insolubles dependiendo del pH (Vassilev *et al.*, 2006). Con el fin de aumentar la disponibilidad de este elemento para las plantas, se utilizan grandes cantidades de fertilizantes de alta solubilidad, pero una gran proporción de estos, después de la aplicación, es rápidamente transformada en forma insoluble (Omar, 1998). La dinámica del P en el suelo, así como, la disponibilidad del mismo a las plantas esta mediada por microorganismos del suelo que desempeñan un papel importante en el ciclo biogeoquímico del P (Richardson, 2001).

Algunos Microorganismos mejoran la disponibilidad de P para las plantas por mineralización de P orgánico en el suelo y la solubilización de fosfatos (Chen *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2002; Pradhan y Sukla, 2005). Un grupo de estos son las

Rizobacterias pertenecen al grupo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Bashan y Holguín, 1998), y entre ellos se encuentran los géneros ***Pseudomonas***, ***Azospirillum***, ***Burkholderia***, ***Bacillus***, ***Enterobacter***, ***Rhizobium***, ***Erwinia***, ***Alcaligenes***, ***Arthrobacter***, ***Acinetobacter*** y ***Flavobacterium*** entre otros (Andrews y Harris, 2000; Kuklinsky-Sobral ***et al.***, 2004). El mecanismo más común en la solubilización de fosfato mineral es realizado a través de los ácidos orgánicos sintetizados por las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) (Goldstein, 1995; Krishnaveni, 2010) y el fosfato orgánico es mineralizado por enzimas fosfatasas excretada por algunos microorganismos produciendo la liberación de este elemento (Chen ***et al.***, 2006; Pradhan y Sukla, 2005). El fósforo finalmente es absorbido por las plantas y utilizado para su desarrollo (Kang ***et al.***, 2002).

Con el objetivo de evaluar el efecto en la promoción del crecimiento vegetal en plantas de tomate (***Solanum lycopersicum***) a través de varios mecanismos, se estudió la capacidad fisiológica de solubilización de fosfatos tanto inorgánicos como orgánicos, la producción de compuestos indólicos totales y sideróforos de seis aislamientos bacterianos.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la inoculación de bacterias con potencial para la promoción del crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípica y bioquímicamente rizobacterias presente en este estudio.
- Determinar las capacidad de promoción de crecimiento vegetal a las bacterias de estudio *in vitro*.
- Evaluar la respuesta del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) a la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal a nivel de invernadero.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades del cultivo tomate

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *lycopersicum*

Nombre común: Tomate, tomatara, jitomate

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva anual, puede desarrollarse de forma rastrera, semirecta o recta, y su crecimiento es limitado. Su tallo principal tiene de 2 a 4 cm de diámetro en la base y está cubierto por pelos glandulares y no glandulares que salen de la epidermis; Jaramillo *et al.* (2007) sobre el tallo se van desarrollado las hojas compuestas con foliolos peciolados, lobulados y con bordes dentados, en número de 7 a 9 y recubiertos de pelos glandulares y estas se distribuyen de forma alternativa sobre el tallo (Paredes, 2009). El sistema radicular del tomate es superficial y está constituido por raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias; dentro de la raíz se encuentra la epidermis donde se ubican los pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes. La flor es perfecta y hermafrodita, regular e hipógina y consta de cinco o más sépalos y de seis o más pétalos; tiene un pistilo con siete estambres, unidos en sus anteras y formando un tubo que encierra el pistilo, las flores se agrupan en racimos simples ramificados que en el tallo y en las ramas del lado opuesto a las hojas, un racimo

puede reunir de 4 a 20 flores dependiendo de la variedad cultivada, son de color amarillas y normalmente pequeñas (uno a dos centímetros de diámetro). El fruto es baya que presenta diferentes tamaños, forma color y consistencia y composición, está constituido por la epidermis o piel, la pulpa y el tejido placentario y las semillas internamente están divididos en lóbulos, que pueden ser bi, tri, tetra o pluriloculares. La semilla del tomate es pequeña, con dimensiones aproximadas de 5 x 4 x 2 mm, éstas pueden ser de forma globular, ovalada, achatada, casi redonda, ligeramente alargada, plana, arriñonada, triangular con base puntiaguda, está constituida por el embrión, endospermo y la cubierta seminal, la cual está recubierta por pelos (Jaramillo *et al.*, 2007).

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Según FAO (2007) el tomate representa para la economía nacional, la treceava fuente de exportación agrícola de importancia. Sin embargo, Colombia no se encuentra en el listado de los 20 primeros países exportadores de este producto, por lo cual se dejan de percibir importantes ingresos para el país. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. (Jaramillo *et al.*, 2007).

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) hace parte de las solanáceas con mayor importancia económica en el país. En Colombia existe un área sembrada de aproximadamente 9.407 ha. y se producen cerca de 470.000 toneladas anuales (CCI, 2009). El principal productor de tomate en Colombia es Boyacá con 1.500 hectáreas, este departamento cuenta con eficiencia productiva, que en años anteriores alcanzó promedios de hasta 80,5 toneladas por hectárea. Otros

departamentos de gran importancia en el cultivo de tomate son Santander con 1.192 hectáreas, Norte de Santander con 3.083 hectáreas y Cundinamarca con 1.091 hectáreas (Ica 2009).

El cultivo de tomate es de gran importancia debido a que gracias a los sistemas de producción bajo invernadero, es posible tener producción durante todo el año. Sin embargo, estos rendimientos sólo pueden ser alcanzados empleando grandes cantidades de agroquímicos, entre los cuales se debe destacar a los fertilizantes, los cuales representan un 25% de los costos totales de producción. Según Jaramillo *et al.* (2007), el cultivo de tomate requiere una fertilización nitrógeno 300-800 kg/ha, fósforo 400 -800 kg/ha y de potasio 600 - 1.100 kg/ha. La alta inversión en agroquímicos es ocasionada, en gran parte, por la baja eficiencia de los fertilizantes utilizados, la cual está directamente relacionada con las características del suelo.

2.2. Requerimientos climáticos del suelo

2.2.1. Temperatura

El manejo racional de los factores climáticos de forma conjunta es fundamental para el funcionamiento adecuado del cultivo de tomate; la temperatura óptima de desarrollo oscila entre los 20 y 30° C durante el día y entre 1 y 17°C durante la noche. No obstante, los valores de temperatura descritos son indicativos, debido a tenerse en cuenta las interacciones de temperatura con el resto de parámetros climáticos (Paredes, 2009).

2.2.2. Humedad

La humedad relativa óptima oscila entre el 60% y 80%. Las humedades relativas muy elevadas favorecen al desarrollo de enfermedades y agrietamiento del fruto y dificultan la fecundación debido a que el polen se compacta, abortando parte de

la flores. El rajado de fruto igualmente puede tener su origen en un exceso de humedad del suelo o riego abundante tras un período de estrés hídrico (Paredes, 2009).

2.2.3. Luminosidad

Una buena luminosidad es importante para obtener buen color de fruto, alto contenido de sólido soluble y una pared del fruto delgado. Los valores reducidos de luminosidad pueden incidir de forma negativa sobre los procesos de la floración y la fecundación así como el desarrollo vegetativo de la planta (Paredes, 2009).

2.2.4. Suelos

La planta de tomate prefiere suelos sueltos, de textura silíceo - arcillosas, ricos en materia orgánicas y con buena capacidad para retener humedad, se desarrolla en suelos arcillosos enarenados. En cuanto al pH, los suelos pueden ser desde ligeramente ácidos hasta ligeramente alcalinos, cuando están enarenados (Paredes, 2009).

Además de ser el sustento físico de la planta, el suelo cumple con dos funciones fundamentales para la producción del cultivo: en primer lugar aporta los nutrientes químicos y en segundo lugar sirve como medio de almacenamiento de agua (Terán *et al.*, 2007).

2.3. Ventajas de la producción bajo invernadero

El cultivo de tomate protegido demanda una inversión inicial en la construcción de infraestructura; presenta altos costos de operación y un seguimiento constante de las condiciones ambientales dentro del cultivo. No obstante, tiene grandes ventajas que lo hacen atractivo como negocio: la protección contra los efectos dañinos de la lluvia, el viento y el granizo; la preservación de la estructura del suelo la posibilidad de manejar el microclima interno; la posibilidad de sembrar

materiales de alto redimiendo; la ampliación de un período de producción; una mejor calidad del producto y la posibilidad de programar la producción para que el periodo salga en las épocas de menor oferta. Todos estos factores llevan a obtener una mayor productividad en el sistema de cultivo del tomate bajo cubierta (Terán *et al.*, 2007).

2.4. Valor nutricional

El tomate es una rica fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C, y E, y de minerales como el fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio (Tabla 1). Tienen un importante valor nutricional ya que incluyen proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico. El tomate es rico en licopeno es el más potente de los antioxidante; pigmento que le proporciona su característico color rojo, también posee glutatión, que ayuda a depurar el organismos de productos tóxicos e impide la acumulación de materiales pesados (Jaramillo *et al.*, 2007).

Tabla 1. Composición nutricional del tomate por 100 gramos de tomate fresco

Elementos	Cantidad
Agua	93,5%
Proteína	0,9g
Grasa	0,1g
Calorías	23
Carbohidratos	3,3g
Fibras	0,8g
Fósforo	19mg
Calcio	7mg
Hierro	0,7mg
Vitaminas A	1,100UI
Vitaminas B1	0,05mg
Vitaminas B2	0,02mg
Vitaminas C	20mg
Niacina	0,6mg

2.5. El fósforo en el suelo

El fósforo en el cultivo de tomate a menudo aparece como nutriente limitante en los suelos agrícolas, cualquiera sea su forma de manejo. No es posible capturarlo biológicamente desde el aire, como ocurre con el nitrógeno, y su ciclo natural involucra largos periodos, lo que en términos de manejo agrícola equivale a decir que no se puede depender del ciclo del fósforo, sino de la posibilidad de generar determinados flujos y sub-ciclos de él al interior de los sistemas suelo-agua-organismos vivos (Miller y Tyler, 2006).

Sin embargo, los sub-ciclos se ven dificultados por el hecho que los equilibrios de reacción del fósforo tienden a mantener la mayor parte de él en condiciones no disponibles para las plantas o los microorganismos (Miller y Tyler, 2006).

Los factores de biodisponibilidad del fósforo en los suelos son desfavorables. Su concentración en el suelo es aparentemente alta (> 50 ppm) pero su disponibilidad es baja, debido quizás a la baja actividad biológica y pH del suelo. Igualmente las concentraciones foliares son reducidas, lo cual confirma la biodisponibilidad limitada del P en los suelos; restringido por la baja actividad biológica y disponibilidad de materia orgánica mineralizable, además de las formas insolubles de fosfatos de calcio en medios básicos (Gauggel, 2001). Las plantas deben absorber el fósforo del suelo, donde se encuentra en altas concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 ppm, estos niveles altos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Graetz, 2002).

La deficiencia del fósforo en el cultivo de tomate disminuye drásticamente la floración, la producción y la calidad de fruto, produce raquitismo en la planta, los

tallos son delgados y fibrosos con una coloración purpura opaca; las hojas adquieren una coloración verde oscuro azulado, acompañada de tintes bronceados o púrpuras; cuando la deficiencia es muy severa, se produce caída de hojas, flores, fruto y la maduración es muy tardía (Jaramillo *et al.*, 2007).

2.6. Fertilización química

La utilización de fertilizantes es requerida en todos los sistemas de producción agrícola, a largo plazo, con fines de mantener e incrementar los rendimientos de los cultivos, sobre todo cuando se extrae totalmente la planta del sistema de producción. El uso de los fertilizantes comenzó hace más de un siglo, y está basado en el concepto químico de la nutrición de las plantas; este uso ha influido ampliamente en el incremento de la producción agrícola y el mejoramiento de la calidad de los alimentos. Un efecto benéfico del uso de los fertilizantes ha sido su contribución en la estabilización de los rendimientos de los cultivos, induciendo resistencia a ciertas enfermedades, plagas o estrés climático. Además, las tasas de retorno del capital invertido a los sistemas de producción se han incrementado con base a una producción más eficaz (Salgado *et al.*, 2006).

Los fertilizantes fosfóricos una vez absorbido como HPO_4 y H_2PO_4 , este fósforo circula y se traslada en el vegetal como fosfato monobásico, siendo interiormente un elemento muy móvil. Interviene en la formación de nucleoproteínas, ácidos nucleico y fosfolípidos. Tiene una vital importancia en la división celular, la respiración, síntesis de azúcar, grasas y proteínas, la acumulación de energía (con los compuestos ATP y NADP), en los fenómenos de fosforilación y la regulación del pH de las células (sus ácidos y sales de metal fuerte forman soluciones buffer que regulan el pH de las soluciones celulares). Este elemento se acumula principalmente en los tejidos activos (síntesis y respiración), los

meristemas (puntos de división celular) y semillas y frutos (Rodríguez, 1982; Salgado *et al.*, 2006).

Los fertilizantes más utilizados en el cultivo de tomate son: Fosfonitrato, sulfato de amonio, superfosfato de calcio triple, nitrato de potasio, fosfato diamónico, calcio magnesio, hierro, zinc, boro, magnesio y molibdeno (Paredes, 2009).

2.7. Mecanismo de transformación del fósforo

2.7.1. Mineralización del fósforo orgánico

El fósforo orgánico (P) es abundante en los suelos y puede contribuir a la nutrición de las plantas y de los microorganismos, debido a la hidrólisis y liberación de fosfatos libres (Condrón *et al.*, 2005). Este proceso es catalizado por enzimas fosfatasas, las cuales son activamente secretadas al suelo por diversas plantas y microorganismos del suelo en respuesta a la demanda de fósforo o pasivamente liberadas por células en descomposición (Quiquampoix y Mousain, 2005).

De las fosfatasas presentes en el suelo las fosfomonoesterasas son las más estudiadas. Este grupo de enzimas actúan sobre una serie de compuestos fosfatados de bajo peso molecular P con enlaces monoéster, incluyendo mononucleótidos, fosfatos de azúcar, y polifosfatos (Reid y Wilson, 1971). Estas enzimas no pueden iniciar el clivaje del ácido fitico (myo-inositolhexaquisfosfato), aunque pueden catalizar la hidrólisis de inositoles fosfatos de orden menor (Cosgrove, 1980).

Otra encontrada es la fosfodiesterasa que participan en la degradación de fosfolípidos y ácidos nucleicos, que constituyen la mayoría de los insumos P orgánicos suelo (Cosgrove, 1967). Las fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas son necesarias para liberar fosfato libre a partir de un diéster fosfato; la hidrólisis inicia por la liberación de un monoéster fosfato por la fosfodiesterasa, el cual debe

ser hidrolizado por la fosfomonoesterasa para liberar el fósforo que será captado biológicamente (Tuner y Haygarth, 2005).

2.7.2. Solubilización de fósforo

La evidencia de la presencia natural de microorganismos solubilizadores de fósforo rizosférico (BSF) se remonta a 1903 (Khan *et al.*, 2007). Entre toda la población microbiana en el suelo, BSF constituyen 1 a 50%, mientras que los hongos solubilizadores de fósforo (HSF) son sólo el 0,1 al 0,5% en P potencial de solubilización (Chen *et al.*, 2006). Entre las comunidades de bacterias del suelo, las cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter* se han descrito como las más eficaces solubilizadores de fosfato (Whitelaw, 2000; Igual *et al.*, 2001).

2.7.2.1. Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos que solubilizan fosfato son de bajo peso molecular y poseen uno o más grupos carboxilo. Dependiendo de las propiedades de disociación y el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos tienen carga negativa, por lo que pueden formar complejos con cationes metálicos en solución y el desplazamiento de aniones de la solución del suelo (Stevenson, 1967; Sagoe *et al.*, 1998).

Los ácidos orgánicos son importantes en la agricultura, por que forman complejos con metales, solubilizan metales y participan en su transporte (Jones *et al.*, 2003). Ácidos como el oxálico, cítrico, láctico, tartárico y 2-cetoglucónico tienen propiedades quelantes y solubilizadoras sobre los metales (Babu-Khan *et al.*, 1995). La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales puede atribuirse a que disminuyen el pH y, más aún, a la formación de complejos estables con Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} . Reacciones similares ocurren al prevenir la fijación de fosfatos añadidos al suelo como fertilizantes.

2.8. Sideróforos

Uno de los mecanismos por medio de los cuales puede presentarse antibiosis es la producción de sideróforos, sustancias orgánicas de bajo peso molecular, con alta afinidad a Fe^{3+} . Los sideróforos son producidos por microorganismos y plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, pero ellos difieren en su eficiencia de producción (Neilands y Leong, 1986).

Los sideróforos quelatan al ion férrico, en la rizosfera, y puede originar la inhibición del crecimiento de otros microorganismos, incluyendo microorganismos patogénicos, cuya afinidad por el hierro es baja (Carcaño *et al.*, 2006). La competencia por el hierro es probablemente más importante en la rizosfera que en el resto del suelo Glick y Bashan (1997) mencionan que la producción de sideróforos por bacterias inhibe a patógenos (hongos, hongos y/ virus) de plantas *in vitro* y también promueve el crecimiento de plantas en el suelo. La habilidad de los sideróforos para actuar como agentes efectivos supresores de enfermedades es afectada por el tipo de planta, la especificidad del fitopatógeno a suprimir, la composición del suelo y la bacteria que sintetiza los sideróforos. La capacidad de las bacterias del suelo de producir y utilizar los sideróforos puede conferir ventajas ecológicas en la colonización de la rizosfera y la superficie de las plantas (Carcaño *et al.*, 2006).

2.9. Indoles totales

El mecanismo de acción directo de las PGPR por excelencia es la producción de sustancia de crecimiento vegetal. Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* liberan ácido indol-acético (AIA), en la rizósfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento

especialmente marcado cuando éstas están en estado de plántula (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Esta importante auxina natural secretada por bacterias (Glick *et al.*, 1999) se puede sintetizar a través de las vías dependiente de triptófano e independiente de triptófano, aunque la importancia de la vía de este último sigue siendo debate (Cohen *et al.*, 2003). Estas sustancias reguladoras de crecimiento vegetal estimulan el desarrollo del sistema radical y el crecimiento general de la planta huésped. Al mismo tiempo, el consecuente incremento en la producción de metabolitos vegetales, utilizados por las bacterias para su propio crecimiento, pondría de manifiesto un beneficio recíproco en la relación planta bacteria (Patten y Glick, 2002).

Las auxinas son reconocidas como estimulante de etileno en varios tejidos el cual incrementa el tamaño de los frutos al estimular el crecimiento de las células, ya que actúa sobre la elongación y la división jugando un papel fundamental el crecimiento de órganos y frutos (Salisbury *et al.*, 1994).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de la investigación

El presente estudio se llevó a cabo en Corpoica, Centro de investigación Tibaitatá en el laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB). El centro de Investigación se encuentra ubicado en el Kilómetro 14 Vía Mosquera (Cundinamarca- Colombia), a una altura de 2543 m; localizado geográficamente a 4°41'43" de latitud norte y 74°12'30" de latitud oeste.

3.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas empleadas en el estudio fueron proporcionadas por el banco de Microorganismos del Laboratorio de Control Biológico y el Banco de Microorganismos con Potencial Biofertilizante del Laboratorio de Microbiología de Suelos (LMS) de Corpoica. Éste primero proporcionó las cepas *Pseudomonas fluorescens* PSO13, *Pseudomonas putida* PSO14, y *Bacillus sp.* BEOO2 y BEOO3, las cuales habían sido previamente identificadas genéticamente Y aisladas de cultivo de fique. Las cepas TVL-1 y TVL-2 fueron provistas por el Laboratorio de Microbiología y aisladas de suelo de tomate. La cepa UV1 (control) fue provista por el LMS e identificada como *Enterobacter agglomerans* (Caballero *et al.*, 2007).

Estas cepas fueron mantenidas en el medio de cultivo SRSM-PR modificado con roca fosfórica al 0.5% como fuente de fósforo (en g/l: glucosa 10.0, extracto de levadura 0.5, $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 0.5, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, púrpura de bromocresol 0.1, Agar 15.0, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5, pH: 7.2 a 4°C. En el (Anexo 1) se muestra la composición química de la Roca Fosfórica empleada en el estudio.

4. METODOLOGÍA

A las cepas en estudio se les realizaron las siguientes caracterizaciones:

4.1. Caracterización fenotípica

4.1.1. Caracterización microscópica y macroscópica

Las caracterizaciones microscópicas fueron realizadas empleando tinción de Gram y microscopía óptica. La descripción macroscópica se realizó sobre medio SRSM-RP y se evaluaron características como color, aspecto, elevación, bordes de la colonia (Córdova –Bautista *et al.*, 2009)

4.2.2. Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica de las cepas fue realizada empleando el Kit API 20 de bioMérieux.. El cual consta de 20 microtubos con medios deshidratados que combinan 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. Mediante esta técnica se observó la actividad metabólica de los aislamientos inoculando una suspensión bacteriana de cada una de las cepas en estudio en solución fisiológica en cada microtubo del test API20 y la observación tras un período de incubación de 18 a 24 h con una temperatura de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.3. Caracterización molecular

4.3.1. Extracción de ADN genómico

Un cultivo de 16 h de las bacterias TVL-1 y TVL-2 en medio LB fue centrifugado 10 veces, haciendo centrifugaciones sucesivas. A partir del centrifugado, se tomaron 300 μL y se llevaron a un microtubo con perlas circonio (0.25g) de radio 1.0 mm A esto se le adicionaron 1.000 μL de buffer de lisis, 100 μL de solución de acetato de potasio y 100 μL de agua destilada, esto se llevó a la congelador– 80 $^{\circ}\text{C}$ hasta la congelación, 100 μL de agua destilada, esto se llevó a centrifugación

durante una hora, la ruptura celular se realizó en Mini-Beaart-8 Biospec products durante 1 minutos, tiempo se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. De aquí se transfirieron 300 µL a un tubo y se adicionaron 600 µL de Glass Milk, la mezcla se hizo durante 5 minutos y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 500 µL de etanol frio al 70%. Se llevó agitación por 1 minuto y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minutos. El sobrenadante se descartó y se permitió secar por inversión, el pellet se resuspendió en 100 µL tipo biológica molecular (Rodríguez y Rodríguez, 2004).

4.3.2. Ampliación por PCR de la región 16S rRNA

La PCR se corrió en un termociclador Bio-rad, bajo condiciones prestadas en la (Tabla 2).

Tabla 2. Ciclos y temperaturas utilizadas para la amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S por medio de PCR

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo
1	95	2'
2	95	30''
3	57	30''
4	72	1'
5	Paso 2 al 4 se repite	35 veces
6	72	7'

Los primers utilizados 27F y 1492R. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa TAE1X (Tris-borato-EDTA) al 2%. Se utilizó un marcador masa 1kb un transiluminador PTC-100 MS researcher inc.

Los productos de la reacción de PCR fueron cuantificados y posteriormente secuenciados empleando el kit Big Dye, Applied Biosystems las secuencias fueron analizadas y editadas en el programa MEGA 4 y luego se compararon

datos de las bases de datos no redundante (nr) del GenBank usando el algoritmo BLASTn.

4.4. Solubilización de fósforo

4.4.1. Análisis cualitativo de solubilización de fosfato

Se sembró un inóculo para cada cepa de 10 mL en medio de cultivo SRSM-PR, después de 24 horas de incubación, las suspensiones fueron centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 minutos. Las células separadas fueron suspendidas en NaCl al 0.85% y ajustado a una $OD_{600} = 0.500$. Se sembraron alícuotas de 50 μ L sobre una placa de petri con agar SRSM-PR con púrpura de bromocresol (como indicador de cambio de pH del medio) a razón de una microgota por caja. Las placas fueron incubadas durante 48 h a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Se midieron los halos generados a los 24 y 48 h, y con estos se calculó el índice de solubilización empleando la fórmula descrita a continuación:

$$IS = \frac{\text{Diámetro halo} + \text{Diámetro de colonia}}{\text{Diámetro colonia}}$$

4.4.2. Análisis cuantitativo solubilización de fosfato

Cada una de las cepas se colocó en caldo SRSM-PR y se incubaron durante 12 días a 150 rpm. Posteriormente 24 mL de los cultivos se centrifugaron a 3.000 rpm y se emplearon 0.5 mL del sobrenadante para la prueba de azul de fosfomolibdeno (Fiske y Subbarow, 1925). El espectro de absorción del producto de reacción se midió a 712 nm en espectrofotómetro (GENESYS TM 10 Series), la lectura se reportó en partes por millón (ppm) de fosfato soluble, reemplazando las absorbancias a través de la curva patrón. Para la preparación de la curva patrón (Anexo 2) se preparó una solución stock de fosfatos de 150 ppm a partir de esta solución y con la ecuación $V_1 * C_1 = V_2 * C_2$ se determinaron las

concentraciones finales de fosfatos las cuales fueron leídas por triplicado en un espectrofotómetro (GENESYS TM 10 series).

4.5. Estandarización del inóculo

4.5.1. Curva de peso seco

Se prepararon los diferentes inóculo con 150 mL de cada cepa TVL-1, TVL-2, PSO13, PSO14, BEOO2, BEOO3, en caldo SRSM con un periodo de incubación de 30h, temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 150rpm en agitador orbital. Posteriormente 100mL del inóculo se llevaron a centrifugación 6.000 rpm durante 10 min. descartando el sobrenadante y se resuspendieron las células en solución salina estéril- SS- (NaCl, 0.85%) hasta completar un volumen de 100 mL, esto se hizo dos veces. La suspensión celular se repartió en tubos de ensayo con peso inicial conocido (10 mL/ tubos de ensayo) y se utilizaron cinco tubos de ensayo adicionales con solución salina estéril (10 mL) para determinar el peso de ésta en la suspensión celular previamente preparada. Todos los tubos fueron llevados al horno a una temperatura 105°C durante 24 h y se pesaron nuevamente, los datos fueron registrados cuando el peso de los tubos fue constante, las 15 mediciones se hicieron por triplicado. Para el cálculo de peso seco se utilizó la siguiente expresión:

$$Bm_{ps\ i} = T_{susp.i} - T_{ss} - T_{vacío\ i}$$

Donde Bm_{ps} es la biomasa en peso seco, $T_{susp.i}$ es el peso de cada tubo con suspensión celular, T_{ss} es el peso promedio de los tubos con solución salina y $T_{vacío\ i}$ es el peso de cada tubo vacío, i es el valor de referencia de cada tubo. Se promediaron los diez tubos, este valor se multiplicó por el factor de corrección y se obtuvo la concentración del peso seco de biomasa en el inóculo inicial (150

mL), además se promediaron los pesos de los cinco tubos con solución salina para la realización de los cálculos pertinentes.

Por otra parte se tomó el cultivo restante (50 mL) y se prepararon diluciones seriadas (1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/8, 1/10, 1/20, 1/30) y se midió absorbancia en un espectrofotómetro (GENESYS TM 10 Series) $\lambda = 540$ nm para realizar la curva patrón de peso seco, se empleó el medio SRSM estéril como blanco (ANEXOS 3,4,5,6,7y 8).

4.5.2. Cinéticas preliminares de crecimiento de los microorganismos

Se prepararon suspensión de solución salinas estériles (NaCl 0.85%) a partir de las cajas con las cepas TVL-1, TVL-2, PSO13, PSO14, BEOO2, BEOO3 y se usó espectrofotometría y la curva de peso seco para obtener una concentración de 2 g de célula /L del inóculo. Se preparó un inóculo con un volumen final 2.500 mL en un medio SRSM sin roca fosfórica sin indicador de pH en relación 1/2 y se inóculo con un pre-inóculo 0.1%, esto se realizó por triplicado con temperaturas de incubación de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150 rpm. Se determinó la absorbancia de cada inóculo a razón intervalos de dos horas. La curva fue detenida cuando el valor de absorbancia fue similar entre mediciones consecutivas reflejando el inicio de la fase estacionaria (Anexo 9,10,11,12,13 y 14).

4.5.3. Actividad enzimática de la fosfatasa

La determinación se llevó a cabo mediante la técnica de *p*-nitrofenil fosfato, propuesta por (Tabatabai y Bremner, 1969).La cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina de las cepas se determinó tomando 1400 μL de cada una de las muestras del cultivo, las cuales reaccionaron con 1800 μL de *p*-nitrofenil fosfato al 0.08% (v/v) durante una hora a $30 \pm 2^\circ\text{C}$; la reacción se detuvo con 3150 μL de

NaOH 20 mmol; las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos y posteriormente, se realizó la lectura en un espectrofotómetro (GENESYS TM 10 Series) $\lambda = 540$ nm.

Para la preparación de la curva patrón (Anexo 15) se realizó una solución stock de p-nitrofenil fosfato de 1000 $\mu\text{mol/L}$ en buffer fosfato con pH 7.0. Por medio de la ecuación $V1 * C1 = V2 * C2$. Se determinaron las concentraciones finales de p-nitrofenil fosfato las cuales fueron realizadas y leídas seis veces en un espectrofotómetro (GENESYS TM 10 Series) $\lambda = 540$ nm.

4.6. Sideróforos e Indoles totales

4.6.1. Síntesis De Sideróforos

Se evaluó semi-cualitativamente la capacidad para producir sideróforos empleando la técnica de cromo azurol sulfonato (CAS) (Schwyn B. y Neilands J.B. 1987). Cada cepa se sembró en medio de cultivo MM9 suplementado con CAS durante 24 h y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue resuspendido en NaCl 0.85% y ajustado a una $OD_{540} = 0.200$. Se tomaron alícuotas de 10 μL de la suspensión, y se sembraron por triplicado sobre una placa de petri con agar CAS a razón de una microgota por caja. Las placas fueron incubadas durante 48h a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Se midieron los halos generados a los 24 y 48 horas.

La producción de sideróforos se observó por un cambio en el color del agar CAS de verde azulado a naranja, lo que produce la formación de un halo claro alrededor de cada una de las colonias.

4.6.2. Producción Indoles totales

Para detección y cuantificación de los Indoles totales producidos por las cepas de interés a evaluar se realizó una curva de calibración con el reactivo de Salkowsky

preparado a base de ácido sulfúrico y cloruro férrico (Glickmann y Dessaux, 1995). A partir de los cultivos de los microorganismos a evaluar se realizó una suspensión celular en medio K-lactato a temperaturas de incubación de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ a una agitación constante 200 rpm por 24 h, ajustado a una $\text{OD}_{600} = 1.00$ para cada cepa se inocularon por triplicado erlenmeyers de 50 mL, con 10 mL de medio K-lactato suplementado con triptófano ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$), se llevaron a incubación de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ a 200rpm durante 72 h a temperatura ambiente. De cada fiola se tomaron 1,2 mL se centrifugaron por 10 minutos a 10.000rpm y a 1 mL del sobrenadante se le agrego 1mL del reactivo de Salkowsky, se dejó reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y posteriormente, se realizó la lectura en un espectrofotómetro (GENESYS TM 10 Series) $\lambda = 540\ \text{nm}$. Con los datos obtenidos de absorbancia de los muestreos de los cultivos se interpolaron los datos con la ecuación de la recta de la curva patrón (Anexo 16) y se determinó la cantidad de Indoles totales producidos en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.7. Evaluación bajo condiciones de invernadero

El experimento en invernadero bajo condiciones de invernadero se desarrolló con un diseño completamente al azar, con ocho tratamientos (Tabla 3), tres repeticiones y tres unidades experimentales por repetición. Las variables evaluadas fueron: longitud de la parte aérea (Cm), longitud radical (Cm), peso seco de la parte aérea (g), peso seco de la raíz (g), área foliar (Cm^2), flores (#), frutos (#). Las raíces de las plántulas (variedad Sofía) fueron sumergidas en una suspensión bacteriana de 200 mL a una concentración de $10^8\ \text{UFC}/\text{mL}$ en medio SRSM-RP durante 30 minutos y transferida a bolsas plásticas de 2 kilos. El suelo sin esterilizar fue previamente pesado y tamizado a 2 mm.

El experimento se mantuvo bajo condiciones de invernadero por tres meses a una temperatura mínima de 7°C y máxima 37°C, humedad de rocío y buena penetración de luz. Se utilizó un suelo de textura franco -limoso y pH 5,95. Se realizaron muestreos destructivos cada mes durante tres meses. La fertilización química (Tabla 4) se realizó cada quince días en diferentes dosis según lo recomendado por análisis químico (Tabla 5), fertilización biológica se realizó al primer y segundo mes de sembrada las plantas con 1 mL de los inoculo.

Tabla 3. Tratamientos establecidos en el ensayo del invernadero

Tratamiento	Descripción
T0	Testigo absoluto (Sin fertilización química y sin inoculación)
T1	Testigo químico (100% de la fertilización química)
T2	Testigo biológico (50% de fertilización química y 50% de 1mL inóculo UV1(Control))
T3	50%de fertilización química y 50% de 1mL inóculo TVL-1
T4	50% de fertilización química y 50% de 1mL inóculo TVL-2
T5	50% de fertilización química y 50% de 1mL inóculo PSO13
T6	50% de fertilización química y 50% de 1mL inóculo PSO14
T7	50% de fertilización química y 50% de 1mL inóculo BEOO2
T8	50% de fertilización química y 50% de 1mL inóculo BEOO3

Tabla 4. Fertilización química por bolsas en gramos 100% y 50 %

Parámetro	100% Fertilización química (g)			50 % Fertilización química (g)		
	1° Dosis*	2° Dosis*	3° Dosis*	1° Dosis*	2° Dosis*	3° Dosis*
Fosfato tricálcico	3.0	2.0	-	1.5	1.0	-
Urea	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2.0
Sulfato de magnesio	2.0	2.0	-	2.0	2.0	-
Sulfato de cobre	0.2	-	-	0.2	-	-
Sulfato de zinc	0.6	0.6	-	0.6	0.6	-
Sulfato de manganesio	0.4	0.4	-	0.4	0.4	-
Borax	0.4	0.4	-	0.4	0.4	-

* 1° Dosis (15 días d.e), 2° Dosis (30 días d.e), 3° Dosis (45 días d.e)

Tabla 5. Análisis químico del suelo empleado en el experimento bajo condiciones de invernadero

Parámetros	Resultados
pH	5.95 ± 0.07
Contenido de material orgánico %	15.1 ± 0.21
Fósforo (ppm)	13.6 ± 0.70
Azufre (ppm)	12.6 ± 0.70
Cationes intercambiables (cmol/kg)	
Calcio	4.72 ± 0.69
Mangnesio	1.11 ± 0.35
Potasio	1.95 ± 0.75
Sodio	0.39 ± 0.15
Capacidad efectiva de Intercambio catónico	8.26 ± 1.81
Conductividad eléctrica (dS/m)	0.69 ± 0.20
Elementos menores (ppm)	
Hierro	134.5 ± 16.2
Cobre	1.85 ± 0.07
Manganeso	17.30 ± 0.01
Zinc	3.45 ± 0.90

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones

4.8. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a una evaluación estadística empleando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con 95% de confianza.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización fenotípica

5.1.1 Caracterización microscópica y macroscópica

La descripción fenotípica de las cepas bacterianas TVL-1, TVL-2, PSO13, PSO14, BEOO2, BEOO3 en medio SMRS-RP se describe en la tabla seis y siete.

Tabla 6. Descripción microscópica de las cepas bacterianas en medio SMRS-RP

Cepas Bacterianas	Descripción Microscópica
TVL-1	Bacilos Gram negativos, pequeños y sueltos
TVL-2	Bacilos Gram negativos, pequeños, sueltos en parejas
PSO13	Bacilos Gram negativos, cortos, sueltos y en parejas
PSO14	Bacilos Gram negativos, gruesos y sueltos
BEOO2	Bacilos Gram positivos, gruesos, sueltos y forman cadenas
BEOO3	Bacilos Gram positivos, delgados, sueltos y forman cadenas

Tabla 7. Descripción macroscópica de las cepas bacterianas en medio SMRS-RP

Cepas Bacterianas	Descripción Macroscópica
TVL-1	Colonias cremas, brillante, convexas, redondas, bordes enteros
TVL-2	Colonias transparente, translúcido, convexas, bordes irregular
PSO13	Colonias cremas, opacas, convexas, puntiformes, bordes enteros
PSO14	Colonias cremas, opacas, convexas, puntiformes, bordes enteros
BEOO2	Colonias cremas, opacas, convexas, puntiformes, bordes enteros
BEOO3	Colonias cremas, opacas, convexas, puntiformes, bordes enteros

5.1.2. Caracterización bioquímica

Los resultados de las caracterizaciones bioquímicas de las cepas están relacionadas en la tabla ocho.

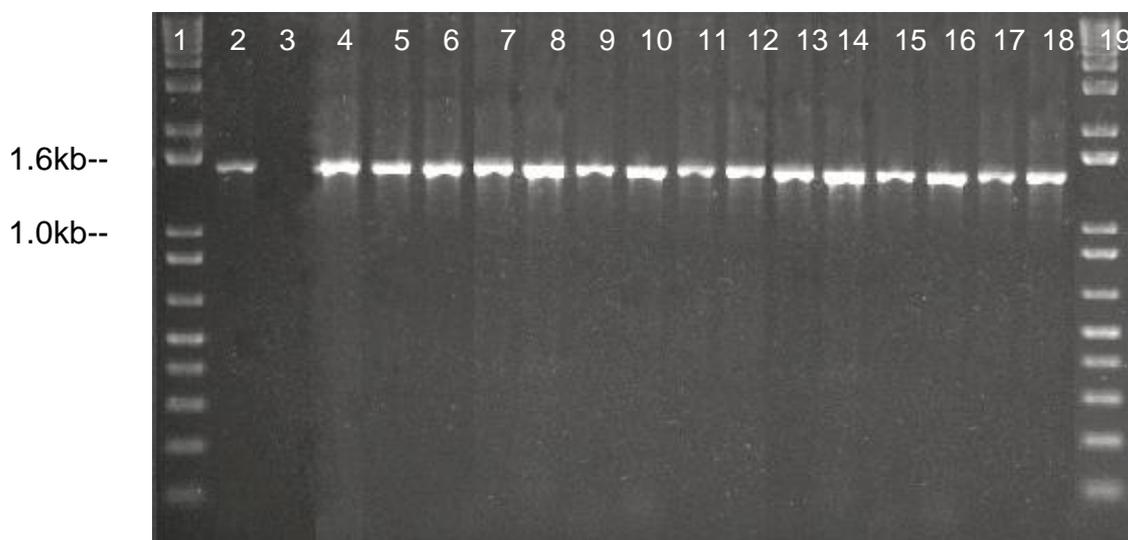
Tabla 8. Prueba bioquímica de las cepas obtenidos API 20

Reacción/Enzima	TVL-1	TVL-2	PSO13	PSO14	BEO02	BEO03
Reducción de nitratos a nitritos	+	+	+	-	+	-
Reducción de nitratos en nitrógeno	-	-	-	-	-	-
Formación de índoles(triptófano)	-	-	-	-	-	-
Fermentación de glucosa	-	-	-	-	-	-
Arginina DiHidrolasa	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	-	-	-	+	+
Hidrólisis (proteasa) (Gelatina)	-	-	+	-	+	+
B-galactosidasa (para-Nitrofenil-BD-galactopiranosidasa)	+	+	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	-	-
Manosa	+	+	+	-	+	-
Manitol	+	+	+	+	-	-
N-Acetil-Glucosamina	+	+	+	-	-	+
GlucoNato potásico	+	+	+	-	-	-
Maltosa	+	+	-	+	+	-
Ácido Caprico	-	-	+	+	-	-
Ácido Adípico	-	-	-	-	-	-
Malato	+	+	+	+	-	+
Citrato trisódico	+	+	+	+	-	-
Ácido fenil Acético	-	-	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	-	-

5.2. Caracterización molecular

De las cepas TVL-1 y TVL-2 fueron caracterizadas por análisis del ADN que codifica 16S rRNA. La electroforesis del producto de PCR arrojó como resultado una única banda de aproximadamente 1.5 kb lo cual correspondió con el tamaño del fragmento esperado en la Fig. 1. La secuenciación de los fragmentos evidenció un 100 y 98% de similitud con el género *Enterobacter sp.* se muestra en la tabla nueve; cuando se comparó con la base de datos no redundante(rn) del

GenBank, empleando el algoritmo BLASTn para las cepas TVL-1 y TVL-2, respectivamente (Anexo 17 y 18)



Pozos: 1 (Marcador peso molecular 1Kb); 2 (Control positivo: bacteria) 3 (Control negativo: bacteria); 7(Cepa TVL-2); 11(Cepa TVL-1).

Figura 1. Bandas observadas en el gel de agarosa al 2%

Tabla 9. Secuencias de las cepas con bases de datos NCBI

Cepas	NCBI	
	Descripción género	%
TVL-1	<i>Enterobacter sp.</i>	100
TVL-2	<i>Enterobacter sp</i>	98

5.3. Solubilización De Fósforo

5.3.1 Análisis cualitativo de solubilización de fosfato

Las cepas de estudio fueron evaluadas para determinar su capacidad para solubilizar una fuente insoluble de fósforo y acidificar empleando medio de cultivo SRSM-PR. Los resultados demostraron que todas las cepas testeadas fueron capaces de solubilizar fósforo y acidificar el medio de cultivo evidenciado por el viraje a amarillo del indicador de pH.

Como control negativo fue empleado medio estéril el cual no dio lugar a la generación de halo de acidificación ni de solubilización, como control positivo interno se empleó la cepa UV1. Las cepas TVL-2 y PSO14 exhibieron los mayores índices de solubilización a las 24 h, mientras que TVL-1 y TVL-2 fueron las mejores transcurridas 48 horas de incubación. En general, se observó que los índices de solubilización incrementaron con el tiempo (Tabla 10). De igual forma, se observaron cambios en el pH del medio de cultivo, lo cual pudo ser relacionado positivamente con el tiempo de cultivo.

Tabla 10. Análisis cualitativo de solubilización de fosfato

Cepa Bacteriana	Índice de Solubilización			
	24h	pH 24h	48h	pH 48h
TVL-1	1.5 ± 0.06 ^{de}	4.45 ± 0.10	5.00 ± 0.3 ^{ab}	4.14 ± 0.12
TVL-2	2.24 ± 0.21 ^{ab}	4.26 ± 0.05	4.07 ± 0.12 ^{ab}	4.05 ± 0.18
PSO13	1.78 ± 0.03 ^{cd}	5.55 ± 0.07	2.30 ± 0.17 ^{cd}	5.35 ± 0.11
PSO14	2.08 ± 0.29 ^{bc}	4.32 ± 0.25	3.30 ± 0.31 ^{bc}	4.23 ± 0.12
BEOO2	1.47 ± 0.06 ^e	5.89 ± 0.10	1.70 ± 0.09 ^{de}	5.70 ± 0.07
BEOO3	1.67 ± 0.14 ^{cde}	6.67 ± 0.18	2.33 ± 0.14 ^{cde}	6.28 ± 0.16
UV1 (CONTROL)	2.92 ± 0.14 ^a	4.64 ± 0.23	4.00 ± 0.25 ^a	4.27 ± 0.16

$$\text{Índice de solubilización} = \frac{\text{Diámetro halo} + \text{Diámetro de colonia}}{\text{Diámetro colonia}}$$

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones.

En general, el mecanismo bacteriano que más se asocia a la solubilización de fósforo inorgánico es la biosíntesis de ácidos orgánicos los cuales disminuyen el pH o actúan como agentes quelantes. Nuestros resultados evidenciaron una capacidad intrínseca de las cepas en estudio para disminuir el pH del medio de cultivo lo cual puede ser explicado por las razones mencionadas previamente o por la extrusión de protones los cuales tienen un efecto similar (Reyes *et al.*, 1999; Delvasto *et al.*, 2008). La síntesis de ácidos orgánicos suele estar asociada

al metabolismo de algunos carbohidratos, en este caso glucosa. En este tipo de microorganismos, ésta suele ser metabolizada vía glucólisis y ciclo de Krebs lo cual da lugar a la generación de ácidos intermediarios los cuales pueden ser excluidos al medio con efectos directos sobre la biodisponibilidad de nutrientes poco solubles y el pH (Gunnarsson *et al.*, 2004).

Varios autores han reportado microorganismos pertenecientes a estos géneros con capacidades importantes de solubilización, aún mas los datos reportados son congruentes con los obtenidos en este estudio, evidenciando además un importante potencial de estos para la solubilización *in vitro* de P inorgánico teniendo en cuenta la mayor insolubilidad de la roca fosfórica empleada.

Seshadri y Ignacimuthu (2002) reportaron índices de solubilización de 2.05 ± 4.11 por *Pseudomonas sp.* y 1.84 ± 4.43 por *Bacillus sp.* en agar Pikovskaya suplementado con 0,5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. De igual forma, Hariprasad y Niranjana en 2009, reportaron índices de solubilización de 1.9 ± 0.0089 por *Enterobacter sp.*; 1.5 ± 0.063 por *Bacillus subtilis* y 2.4 ± 0.033 por *Pseudomonas putida* en medio Pikovskaya suplementado con 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

5.3.2. Análisis Cuantitativo de Solubilización de Fosfato

Con el objetivo de corroborar los resultados previamente obtenidos e investigar un poco más sobre la capacidad de las cepas de estudio para solubilizar fósforo inorgánico, se decidió evaluar en cultivo líquido la capacidad de éstas para liberar P a partir de una fuente insoluble. Los resultados mostraron que todas las cepas fueron capaces de solubilizar la roca fosfórica, donde las cepas TVL-1 y TVL-2, presentaron los mejores resultados ($p < 0.05$) (Tabla 11). Adicionalmente, se evidenció una relación significativa entre la solubilización de fósforo y el pH final del medio de cultivo ($R = -0.67$; $p < 0.05$).

Tabla 11. Análisis cuantitativo de solubilización de fosfato

Cepas Bacterianas	Fósforo Soluble	
	ppm	pH
TVL-1	189.5 ± 0.07 ^a	3.99 ± 0.23
TVL-2	192.5 ± 0.14 ^a	3.81 ± 0.20
PSO13	133.0 ± 0.82 ^d	4.77 ± 0.10
PSO14	144.0 ± 0.04 ^b	3.85 ± 0.27
BEOO2	127.0 ± 0.22 ^e	5.21 ± 0.70
BEOO3	133.0 ± 0.07 ^{bc}	6.02 ± 0.68
UV1(Control)	138.0 ± 0.13 ^{cd}	4.48 ± 0.27

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones

La capacidad bacteriana para solubilizar fósforo, como se mencionó previamente, está determinada por la capacidad de ciertos microorganismos para liberar metabolitos tales como ácidos orgánicos de bajo peso molecular o ciertas enzimas las cuales pueden liberar fósforo a partir de formas orgánicas de este. Ambas estrategias redundan en un aumento en la biodisponibilidad de fósforo en la rizósfera el cual puede ser asimilado por las plantas (Sagoe *et al.*, 1998).

Muchos géneros bacterianos han sido ampliamente reportados por su capacidad para mineralizar o solubilizan fuentes orgánicas o inorgánicas de fósforo, respectivamente. De aquí, destacan géneros como *Pseudomonas* y *Enterobacter*. En particular, se ha evidenciado que estas PGPR pueden solubilizar fósforo mediante la síntesis de ácidos orgánicos como el cítrico, butírico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico y 2-cetoglucónico, entre otros. En suelo, la síntesis de estos ácidos no provoca un cambio en el pH del suelo sino que logra la generación de microambientes acídicos en los cuales la disponibilidad de P es mayor (Rodríguez *et al.*, 2000). Aún más, algunos de estos ácidos tienen una actividad adicional la cual consiste

en actuar como agentes quelantes debido a la presencia de muchos grupos carbonilo, lo que les permite formar compuestos de coordinación con cationes polivalentes como calcio, magnesio, hierro (II o III), entre otros, los cuales se encuentran asociados a iones ortofosfato en la mayor parte de los casos.

Yu *et al.* (2011), reportaron resultados similares a los reportados en nuestro estudio, empleando *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas fluorescens* y el mismo medio de cultivo, pero en este caso, suplementado con fosfato tricálcico, con concentraciones de fósforo disponible que estuvieron entre 81.09 y 233.35 mg/L acompañado de una disminución significativa en el pH luego de 72 h de incubación. De manera similar, Son *et al.* (2005) demostraron que la bacteria *P. agglomerans* solubiliza el fosfato en medio líquido suplementado con 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, al encontrar concentraciones de 209 a 215 mg /L de fósforo soluble . en todos los casos, la solubilización de fosfato insoluble estuvo asociada a una disminución del pH, el cual osciló entre 2.6 y 5.7. Como se evidenciaron con las cepas del presente estudio.

5.4. Liberación de fósforo mediante actividad enzimática

En suelo, la mayor parte del fósforo corresponde a sales inorgánicas insolubles, sin embargo, como resultado del proceso de descomposición de la materia orgánica la liberación de compuestos orgánicos fosforados también se da y en consecuencia, los mecanismos metabólicos para llevar a cabo la toma de éste tipo fósforo representa también una importante fuente para la nutrición vegetal. En primer lugar, fueron establecidas las cinéticas de crecimiento con el fin de esclarecer los tiempos de inicio de la fase estacionaria en cada una de las cepas de estudio, y así realizar los análisis enzimáticos correspondientes. En segundo

lugar, fue determinada la capacidad enzimática de las cepas para liberar fósforo orgánico.

5.4.2. Cinética preliminar de crecimiento de los microorganismos

Determinamos las curvas de crecimiento de cada una de las cepas de estudio estableciendo el inicio de la fase exponencial y así mismo su finalización. De igual manera, establecimos la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de cada unas de las cepas (Tabla 12). Esto, con el objetivo de establecer la fase estacionaria en el cual se evaluaría la actividad fosfatasa la cual está fuertemente ligada al final de la fase exponencial de crecimiento.

Tabla 12. Parámetros cinéticos

Cepas Bacterianas	inicio de fase estacionaria (horas)	Tiempo de duplicación (horas)	Velocidad específica de crecimiento (horas⁻¹)
TVL-1	24	1.90	0.363
TVL-2	23	1.79	0.382
PSO13	23	2.30	0.301
PSO14	18	1.99	0.367
BEOO2	20	2.16	0.319
BEOO3	24	3.90	0.177

5.4.3. Actividad enzimática de la fosfatasa

Los resultados evidenciaron que sólo las cepas TVL-1, TVL-2 y PSO13 fueron capaces de sintetizar la enzima (fosfomonosterasa) encargada de la mineralización del fósforo. La cepa TVL-2 presentó la mayor producción, seguida por TVL-1, mientras la cepa PSO13 obtuvo una mínima expresión de la enzima ($p < 0.05$) comparadas con el control positivo DH5 α (Tabla 13). Las cepas PSO14, BEOO2, BEOO3 y UV1 bajo las condiciones empleadas no presentaron actividad

enzimática. Resultados similares fueron reportados por Park *et al.* (2010) quienes señalan en su estudio que la actividad de la fosfatasa ácida producida por las bacterias aisladas varió de 0.0034 a 0.1401 nM, medido por la producción de p-nitrofenol. Las dos cepas de bacterianas que mostraron la mayor actividad de la fosfatasas acidas fueron identificadas como *Pantoea sp.*, con resultados 0.144 nM y *Enterobacter cloacae*, con resultados de 0.1401 nM de fosfatasas.

Tabla 13. Análisis cuantitativo de Actividad enzimática

Cepas Bacterianas	Actividad Enzimática
	uf=(nM)
TVL-1	0.136 ± 0.006 ^c
TVL-2	0.538 ± 0.003 ^b
PSO13	0.015 ± 0.003 ^d
PSO14	0.000 ± 0.000
BEOO2	0.000 ± 0.000
BEOO3	0.000 ± 0.000
DH5α (Control Positivo)	5.940 ± 0.043 ^a
UV1 (Control Negativo)	0.000 ± 0.000

Uf :Unidades de fosfatasa

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones

Teniendo en cuenta que las cepas empleadas en el presente estudio fueron aisladas a partir de diferentes tipos de suelos y de cultivos, la expresión de la actividad fosfatasa en cada una de ellas puede estar ligada a diversas condiciones ambientales que favorecen o reprimen su síntesis, De Souza (2007) aseveró que la actividad enzimática depende de una larga serie de factores medioambientales. Entre ellos destacan la concentración de sustrato y enzima, la composición del medio de reacción, temperatura, pH, iones, inhibidores, entre otros. De igual manera, Sarapkka (2003) consideró que la actividad de la

fosfatasa en el suelo puede estar relacionada con el porcentaje de materia orgánica presente.

Jaramillo *et al.* (2009) aseguraron que los suelos asociados al cultivo del tomate generalmente poseen altos contenidos de materia orgánica (por encima de 5 %), buen contenido de nutrientes y pH entre 5.8 a 6.8; por el contrario el cultivo de fique se presenta en suelos de textura mediana sílicos-arcillosos y con buena porosidad, poca materia orgánica y un pH entre 5 y 7 no limitante para el desarrollo de aquí su importante rol en recuperación de suelos (<http://www.finagro.com.co/html>). Éste tipo de contrastes pueden explicar parcialmente los resultados evidenciados a nivel de laboratorio. Rotenberg *et al.* (2007) demostraron que la composición y la cantidad de materia orgánica edáfica juegan un rol fundamental en el funcionamiento y sustentabilidad de los sistemas agropecuarios, debido a que impactan significativamente sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

5.5. Sideróforos e Indoles totales

5.5.1. Síntesis de sideróforos

La síntesis microbiana de sideróforos está asociada con el aumento en la captación de hierro, lo cual puede asociarse a una mejor atracción de ese mismo elemento por las plantas y a la protección de estas del ataque de algunos patógenos. En la mayor parte de suelos este elemento es restrictivo debido a su baja biodisponibilidad por precipitación o quelación. La evaluación de la capacidad de las bacterias en estudio para sintetizar sideróforos las cuales son moléculas orgánicas con una alta afinidad para la quelación de cationes polivalentes. Para esto, se empleó la técnica de medición de sideróforos basada en la utilización del compuesto “Chrome Azurol Sulfonato” (CAS) el cual tiene la

capacidad de formar un complejo CAS-Fe el cual tiene color azul a pH cercano a 5.6. Cuando la bacteria crece sobre el medio CAS, la disponibilidad de Fe para esta disminuye drásticamente debido a que la mayor parte se encuentra quelado al CAS.

La bacteria pueda tomar el Fe sintetizando éstas moléculas denominadas sideróforos los cuales tienen mayor afinidad por el Fe que el mismo CAS, cuando el complejo se disocia se genera un cambio en la coloración del medio de cultivo el cual es indicativo de la capacidad bacteriana para sintetizar sideróforos. Las cepas TVL-1, TVL-2, PSO13 y PSO14 fueron capaces de producir este grupo de compuestos, evidenciando un incremento asociado al tiempo. La cepa que presentó mayor producción tanto a las 24 como a las 48 horas fue la cepa PSO14 ($p < 0.05$) (Tabla 14).

Tabla 14. Producción semi-cuantitativa de sideróforos

Cepas Bacterianas	Diámetro de halos (mm)	
	24 h	48 h
TVL-1	2.33 ± 0.57 ^b	12.3 ± 0.57 ^b
TVL-2	4.33 ± 1.54 ^{ab}	14.7 ± 1.00 ^{ab}
PSO13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PSO14	5.67 ± 0.57 ^a	17.3 ± 1.52 ^a
BEOO2	4.33 ± 1.52 ^b	12.3 ± 0.57 ^b
BEOO3	3.00 ± 1.00 ^b	12.7 ± 1.52 ^b
UV1 CONTROL	4.33 ± 0.57 ^b	13.7 ± 0.57 ^b

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones

Cómo se mencionó previamente, los compuestos tipo sideróforos tienen la capacidad de formar enlaces de coordinación con algunos cationes polivalentes. Esto se da, en particular, por la presencia en este tipo de compuestos de ciertos grupos funcionales como el carbonilo, amino o tiol los cuales contienen átomos con uno o varios pares de electrones libres los cuales pueden formar enlaces de

coordinación con elementos desprovistos de electrones en la última capa de valencia.

Esta estrategia ha de mostrado estar directamente relacionada con el control biológico de enfermedades en las plantas (Dutta *et al.*, 2006; Hamdali *et al.*, 2008). Por lo tanto, este tipo de moléculas pueden desempeñar un papel importante en la competencia con microorganismos de la rizósfera y/o actuando como promotores de crecimiento (Omar, 1998). Boopathi y Rao (1999) obtuvieron resultados similares a los reportados por nosotros.

Ellos obtuvieron aislamientos de *Pseudomonas putida* de la rizósfera asociada al cultivo del garbanzo, las cuales produjeron compuestos tipo sideróforos en medio CAS, ellos aseguran que *Pseudomonas putida* parece poseer una eficaz quelación del hierro y el transporte suficiente que conferiría una ventaja en el organismo productor más que en otros microorganismos para la asimilación de hierro en condiciones suficientes, apoyando así su propio crecimiento y suprimir el crecimiento de la planta microorganismos patógenos en la rizósfera.

De igual forma Wani *et al.* (2007) reportaron que cepas de *Bacillus sp.* aisladas de suelos de mostaza y tomate también produjeron sideróforos evaluados mediante la misma técnica en condiciones de ausencia y presencia de un estrés abiótico como lo es la presencia de cromo (Cr^{6+}) 50, 100, 150.

5.5.2 Producción de indoles totales

Al evaluar la producción de compuestos indólicos, se observó un comportamiento similar en todas las cepas evaluadas; presentado mejores resultados con TVL-2 y TVL- 1 ($p>0.05$) (Tabla 15).

Tabla 15. Producción de indoles totales

Cepas Bacterianas	Producción de indoles totales
	($\mu\text{g IAA/ mL}$)
TVL-1	24.61 ± 0.73^{ab}
TVL-2	27.11 ± 0.48^a
PSO13	24.29 ± 2.33^{abc}
PSO14	22.14 ± 1.48^{bcd}
BEOO2	18.43 ± 0.61^d
BEOO3	19.97 ± 3.21^{cd}
UV1 (Control)	19.54 ± 0.41^d

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones

En general, la producción de auxinas por las bacterias, especialmente ácido 3-indolacético han evidenciado influir significativamente sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Varios estudios han demostrado que la producción *in vitro* de AIA y otras hormonas fisiológicamente activas derivadas del L- triptófano, son una característica de las cepas PGPR (Tien *et al.*, 1979; Jain y Patriquin, 1985), aunque existen diferencias entre cepas en la capacidad para sintetizar AIA sobre el medio de cultivo.

Esta capacidad depende de las condiciones ambientales, de la etapa de crecimiento, de la constitución genética y de la concentración de intermediarios (Fallik *et al.*, 1989). Ahmad *et al.* (2005), reportaron resultados similares a los del presente estudio, que en presencia de 5mg de triptófano, seis aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* produjeron AIA en rangos entre 23.4 y 36.2 $\mu\text{g/mL}$. De igual manera, Ali *et al.* (2009), realizaron análisis colorimétricos a cultivos bacterianos en fase estacionaria e indicaron que diferentes aislamientos de *Bacillus sp.* variaron en su capacidad para producir auxinas en presencia y en ausencia de L-triptófano. Las cepas que producían bajos niveles de AIA en ausencia de L-triptófano, al aumentar las concentraciones de este compuesto (200 $\mu\text{g/mL}$ de triptófano), aumentaban la producción de AIA en rangos que

oscilaban entre $19.6 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ y $21 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$. Es importante resaltar que en el presente ensayo se utilizaron concentraciones más bajas de triptófano (100 ppm) para evaluar la producción de AIA, lo cual permite afirmar que las cepas evaluadas pueden ser consideradas como promotoras del crecimiento vegetal por su alta síntesis de AIA.

5.7. Experimento en invernadero

5.7.1 Longitud de la planta

Los resultados evidenciaron que la inoculación con las bacterias de este estudio influyó positivamente sobre la longitud de la parte aérea de las plantas. De manera general, se observó que la inoculación con las bacterias logró estimular la elongación de la planta cuando está se comparó con el testigo absoluto. Igualmente, con respecto al testigo químico no se observaron diferencias significativas en la mayor parte de los casos, no obstante en algunos casos fue posible observar un efecto superior de la inoculación bacteriana.

Los resultados mostraron que en el primer mes de muestreo la inoculación con BEOO3 y UV1 ($p < 0,05$) incrementó el crecimiento de la planta en 15.2% y 15.4% con respecto al testigo absoluto y del 29.5% y 29.7% con respecto al testigo químico, respectivamente. No obstante, las diferencias fueron acentuadas con respecto al testigo absoluto donde las cepas TVL-2 y BEOO2 incrementaron el tamaño de la planta dos veces aproximadamente.

Con respecto al testigo químico las diferencias fueron de 9.14% y 8.89%, respectivamente. En el tercer mes de muestreo, la bacteria que mostró ejercer el mayor efecto fue PSO14 la cual fue casi tres veces mayor con respecto al testigo absoluto, mientras que comparado con el testigo químico, fue del 42.1% (Fig. 2). De la misma manera la longitud de la raíz fue incrementada por la inoculación

bacteriana (Fig. 3). En el primer mes observamos diferencias importantes ejercidas por la cepa UV1 y TVL-1 de casi dos veces con respecto al testigo absoluto y de 33.1% y 17.4% con respecto al testigo químico. En el segundo mes se observó que la cepa PSO13 superó en 53.5% al testigo absoluto y 19.0 % al testigo químico ($p < 0.05$). No obstante, al tercer mes de muestreo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) positivas de todas las cepas con respecto al testigo absoluto y la cepa PSO14 con respecto al testigo químico obtuvo incremento del 200% (Fig. 3).

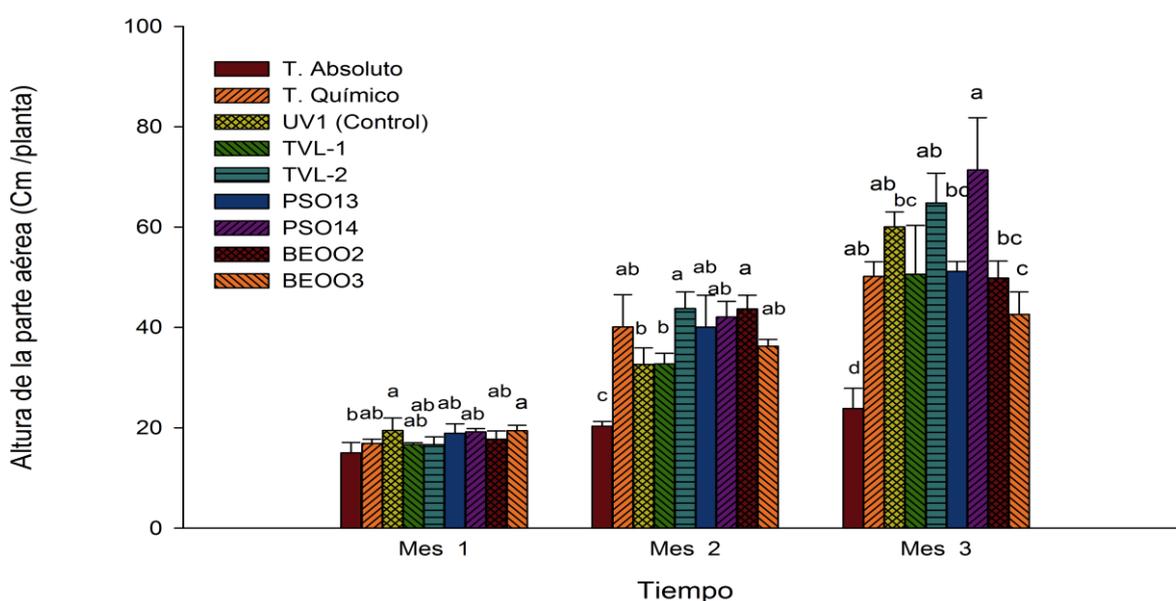


Figura 2. Altura de la parte aérea de la planta de tomate (var. Sofía) por planta. Cada valor es la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$).

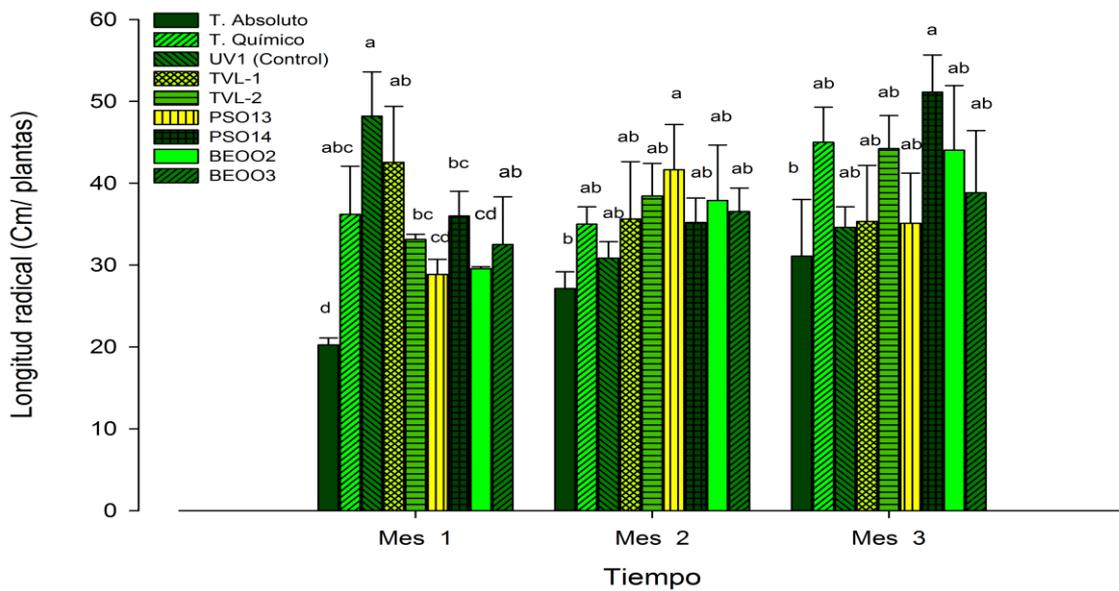


Figura 3. Longitud radical de la planta de tomate (var. Sofía) por planta. Cada valor es la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$).

Los resultados mostraron que la longitud de la planta fue incrementada por la inoculación bacteriana lo que se explica por una mejora en la nutrición de la misma o por la acción de sustancias estimulantes sintetizadas por bacteria las cuales tienen un efecto directo sobre la elongación de la planta. Los resultados evidenciaron que la cepa PSO14 fue la que más pudo influir sobre el proceso de elongación de las plantas de tomate.

Es importante destacar que a pesar que no fue la que mostró los mejores resultados *in vitro* fue la que evidenció un mejor efecto sobre la elongación de la planta. Estos resultados pueden ser explicados con base en la presencia de diferentes condiciones entre las pruebas realizadas en invernadero y laboratorio las cuales pueden influir significativamente sobre la capacidad de las bacterias para promover el crecimiento vegetal.

La PSO14 tuvo la capacidad *in vitro* para solubilizar fósforo inorgánico, elemento fundamental en la fotosíntesis y en la respiración celular, y necesario para el desarrollo de estructuras reproductivas. La disponibilidad de este elemento para ser asimilado por la planta, mejora la calidad del cultivo (Jaramillo *et al.*, 2007). Asimismo, la cepa PSO14 también tuvo la capacidad de producir metabolitos benéficos para la planta, tales como fitohormonas y sideróforos.

Esta evidencia sugiere un aporte fundamental de la PGPR a la nutrición de la planta por tanto, a la mejora de los resultados del crecimiento vegetal (Kumar-Mishra *et al.*, 2010). Kirankuman *et al.* (2008) evidenciaron que el género *Pseudomonas* mejoró significativamente el crecimiento vegetal de plantas de tomate registrando mayor altura, mayor rendimiento del fruto y absorción de nutrientes en la presencia de patógenos, atribuyendo al hecho que esta cepa tiene un alto potencial para la colonización de la raíz. Observaciones similares fueron hechas por Jagadeesh (2000), quien también obtuvo un crecimiento significativamente mejorado del cultivo de tomate por inoculación de cepas aisladas pertenecientes al género *Pseudomonas sp.*

5.7.2. Peso seco de la planta

Uno de los principales resultados que tiene la estimulación por biofertilización es el efecto sobre el tamaño de la planta, sin embargo la información de la longitud de la planta resulta mejor justificada cuando se relaciona con la biomasa seca de la planta la cual no sólo está relacionada con un aumento en la elongación vertical de la planta sino también con el aumento en el crecimiento horizontal de la misma. Por ejemplo, la síntesis bacteriana de auxinas puede tener un efecto importante sobre el desarrollo de raíces secundarias y de pelos radicales,

variables que no están relacionadas con un aumento en la longitud de la raíz sino del peso de la planta.

Los resultados evidenciaron (Fig. 4) que en el primer mes la biofertilización exhibió diferencias significativas con respecto al testigo absoluto mientras que no se presentaron diferencias con el testigo químico. En el segundo mes, todas las cepas mostraron ejercer un efecto positivo significativo sobre el peso de la parte aérea, sin embargo no fueron observadas diferencias en la mayor parte de los casos con respecto al testigo químico. Las cepas que presentaron el efecto más importante sobre el peso seco de la parte aérea de las plantas fueron TVL-2, PSO13, PSO14 y BEOO2. En el tercer mes se observó un patrón diferentes y las diferencias entre cepas se hizo más notoria, aún más con respecto al testigo absoluto. No obstante la cepas la cepa TVL-2 presentó un efecto importante puesto que se mantuvo igual al tratamiento químico y presentó un tamaño cinco veces mayor que el testigo absoluto (Fig. 4).

Con respecto al tamaño de la raíz el aumento de su biomasa tiene fuertes repercusiones en la capacidad de las plantas para asimilar los nutrientes del suelo puesto que representa una mayor exploración del suelo por parte de las raíces (Antoun y Prevost, 2005). Varios estudios han mostrado que el ácido 3-indolacético tiene un importante impacto sobre el desarrollo radicular de las plantas (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009) igualmente se ha mostrado que ciertas bacterias rizosféricas son capaces de sintetizarlo también pudiendo influir de manera importante sobre el desarrollo de las mismas.

No obstante, existen una serie de factores que determinan el éxito de los microorganismos productores de auxinas sobre la elongación de las raíces en la planta dentro de los cuales destacan el tipo de auxina sintetizada, el grado de

cercanía a la raíz de la bacteria y la cantidad que pueden producir cuando se encuentran asociadas a la planta (Ahmad *et al.* 2005).

Nosotros observamos que el peso seco de la raíz de las plantas inoculadas exhibió un mayor valor que el testigo absoluto en el primer mes, sin embargo el tratamiento químico presentó el mejor resultado solo igualado por la inoculación con PSO14, lo cual puede ser explicado por una mayor disponibilidad de nutrientes en suelo en el control con fertilización completa. En el segundo mes las diferencias con respecto al testigo absoluto se acentuaron, mientras que la inoculación con las bacterias influyo sobre el crecimiento de la planta y presentó resultados similares a los obtenidos en el testigo químico. Las cepas PSO13, TVL-1, PSO14 presentaron un incremento significativo de 6.8%, 5.9% y 5.5% con respecto a éste.

Algunos estudios han mostrado que la inoculación con bacterias promotoras causan efecto sobre el desarrollo de la planta de algunas de las moléculas efectoras que ellas liberan estas son específicas y directamente relacionadas a la fase de crecimiento de la planta, luego es posible que este resultado sea producto de este efecto. En el tercer mes, las diferencias se hicieron más notorias. Las cepas TVL-2 y PSO14 mostraron los mejores resultados superando e igualando al testigo químico por 29.0% y 14.4%, y por siete y seis veces con respecto al testigo absoluto (Fig. 5).

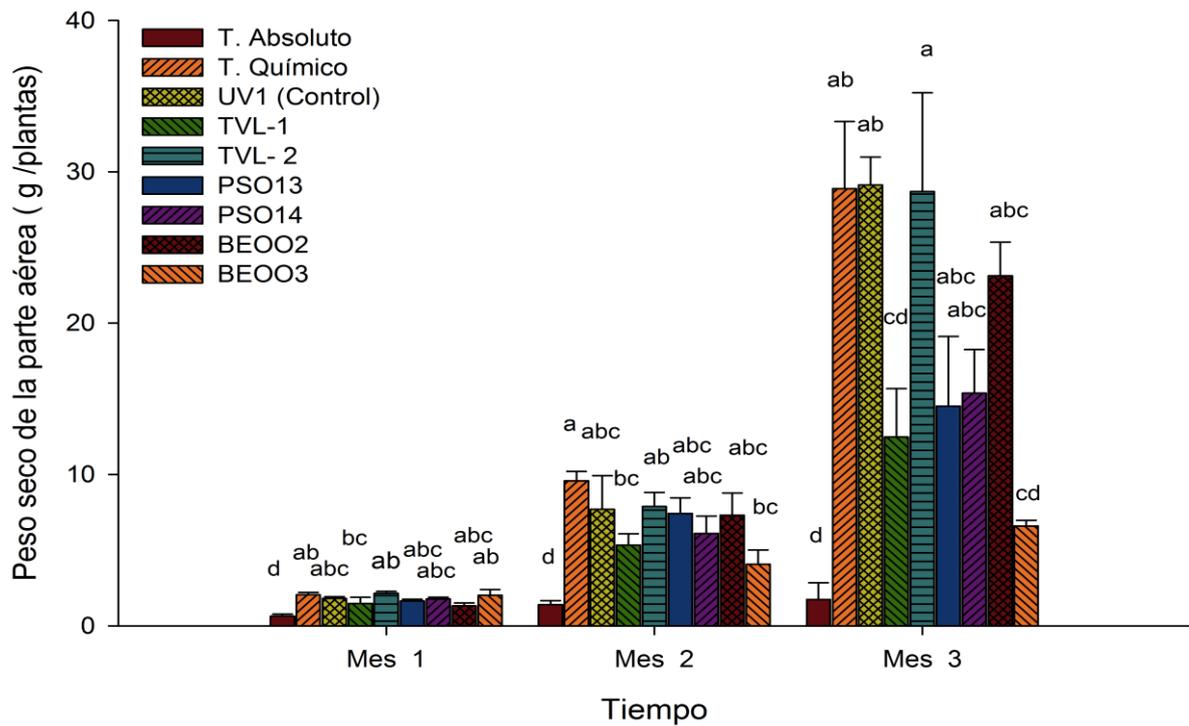


Figura 4. Peso seco de la parte aérea de planta de tomate (var. Sofía) por planta. Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$).

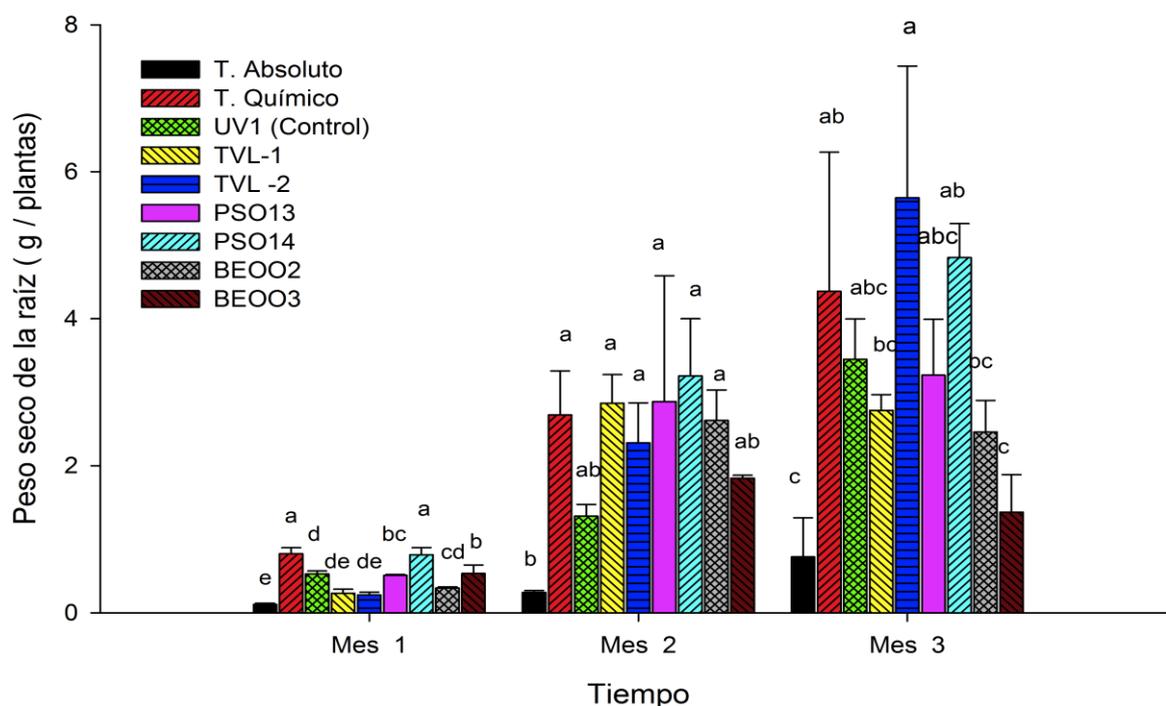


Figura 5. Peso seco de raíz de planta de tomate (var. Sofía) por planta. Cada valor es la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$).

Patten y Glick (2002) aseguraron que el género de *Pseudomonas*, tiene un potencial para estimular el crecimiento de las plantas por la producción de AIA; lo cual se observó en nuestro estudio. De igual manera, Gravel *et al.* (2006) mostraron que la cepa de *P. putida* subgrupo B1 y *Trichoderma atroviride* son capaces de sintetizar AIA a partir de diferentes precursores (Tryptófano, Triptamina y Tryptophol) *in vitro*, y apoya la teoría de que el AIA producido por los microorganismos podrían estar involucrados en la estimulación del crecimiento observado su ensayo en invernadero, los cuales mostraron afectó el crecimiento de las plántulas de tomate.

3.7.3. Área foliar

En el primer mes, todas las cepas presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) positivas con respecto al testigo absoluto. Aún más, la cepa BEOO3 obtuvo un

incremento del 17.0% con respecto testigo químico. En el segundo mes se siguió observando el mismo patrón con respecto al testigo absoluto, pero se evidenció que las cepas PSO14, TVL-2 y TVL-1 presentaron un incremento 36.4%, 24.7% y 8.06% respectivamente con respecto al testigo químico. En el tercer mes las cepa PSO14 y TVL-2 siguieron presentando este comportamiento respecto al testigo absoluto con un incremento de 3 veces aproximadamente y del 36.4% y 24.4% respectivamente con respecto al testigo químico (Fig. 6).

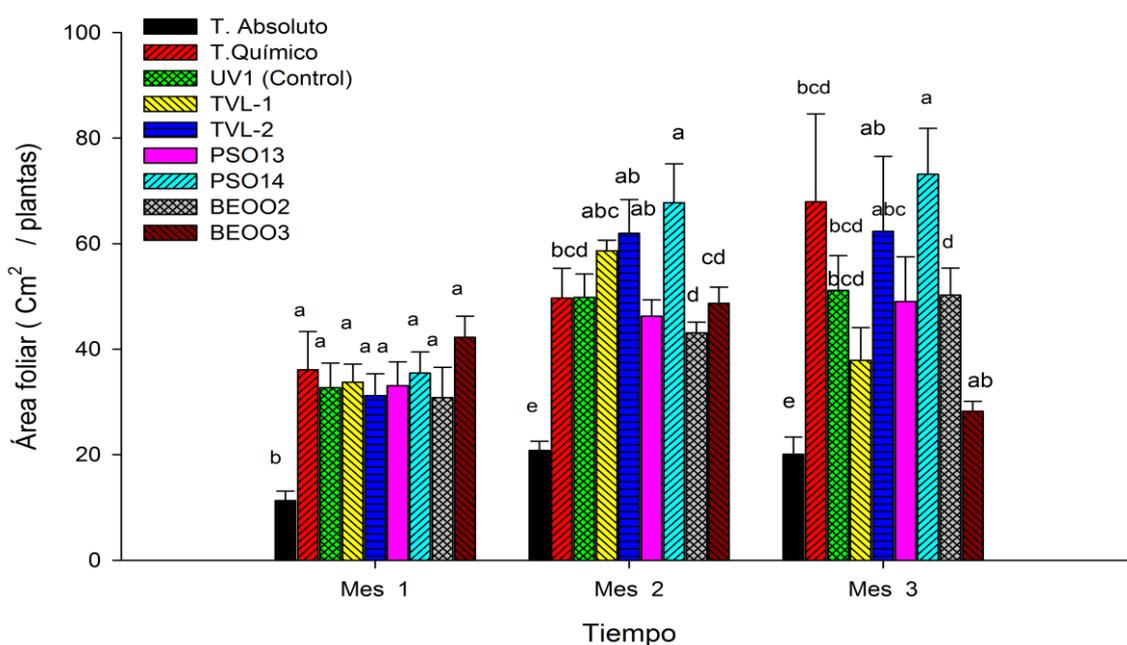


Figura 6. Área foliar de tomate (var. Sofía) por planta. Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$).

El aumento en área foliar es un fuerte indicativo de un aumento en la tasa de actividad fotosintética en las plantas. Esto representa mayores niveles en el contenido de carbono producto de la fijación y en consecuencia un mayor tamaño de la planta (Taiz y Zaiger, 2010). Este aumento en la actividad fotosintética se suele asociar con una mejora en el estatus nutricional de la planta donde la

bacteria pudo llegar a ejercer un importante efecto. En laboratorio, nosotros evaluamos ciertas capacidades metabólicas bacterianas las cuales han mostrado estar estrechamente ligadas a la promoción de crecimiento vegetal: solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de fósforo orgánico, producción de sideróforos, síntesis de auxinas.

Los resultados evidenciaron que las cepas de estudio tienen un importante rol en la solubilización de fósforo, lo cual se puede ver reflejado en el aumento en la biodisponibilidad de fósforo en suelo lo cual influye directamente sobre la captación de fósforo por la planta, elemento el cual a pesar de ser abundante es poco biodisponible luego suele ser una limitante para el crecimiento de la planta. Un aumento en el contenido de fósforo implica un mejor fitness vegetal ya que este elemento hace parte de biomoléculas vitales y en consecuencia de procesos fundamentales para el desarrollo vegetal como la fotosíntesis.

Las bacterias del género *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* son ampliamente encontradas en suelo rizosférico y en estrecha asociación a diferentes géneros vegetales, no obstante la forma en la cual interactúan con la raíz difiere de género a género. Adicionalmente, varios reportes han evidenciado su importante papel en la promoción del crecimiento vegetal.

Los efectos de las bacterias benéficas las cuales se conocen popularmente como PGPR por sus siglas en inglés y que tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas pueden ocurrir a través de mecanismos directos o indirectos, que incluyen la producción de fitohormonas y enzimas que promueven el crecimiento de las plantas, el aumento de la absorción de nutrientes, y la prevención de fitopatógenos nocivos (Glick *et al.*, 1999; Whipps, 2001). Además, la aplicación de las especies de este género permite mejorar la absorción de

fosfato por parte de las plantas (Vassileva *et al.*, 1999).

5.7.4. Número de flores y frutos

En términos agrícolas, los aumentos en la longitud y peso de la planta están directamente relacionados con el aumento en la eficiencia del proceso, es decir, los resultados que hasta ahora se han obtenido demuestran que las estrategias de fertilización probadas basadas en la utilización de una menor dosis de químicos combinado con el uso de ciertos microorganismos con habilidades promotoras de crecimiento vegetal pueden igualar parcialmente o superar la productividad generada por los tratamientos convencionales de fertilización agrícola. No obstante, el parámetro que resulta definitivo en la productividad de un cultivo como el tomate es la cantidad de frutos que se puedan generar, de igual manera el número de flores proporciona un estimativo adecuado de la eficiencia del proceso de fertilización.

Los resultados evidenciaron (Fig. 7) que el número de flores fue fuertemente influenciado por el tratamiento empleado para la fertilización. Es así, como todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control absoluto, no obstante estas diferencias se presentaron solo después del segundo mes cuando el cultivo de tomate inició su proceso de floración. En ese mes, las diferencias entre el tratamiento químico y los bacterianos fueron significativas, donde el número de flores por planta fue casi dos veces superior al resto de los tratamientos.

No obstante, en el mes tres las diferencias se redujeron entre los tratamientos, donde la inoculación con la cepa TVL-2 exhibió los mejores resultados y ninguna diferencia fue exhibida entre otro tratamiento biológico y el testigo químico (Fig. 7).

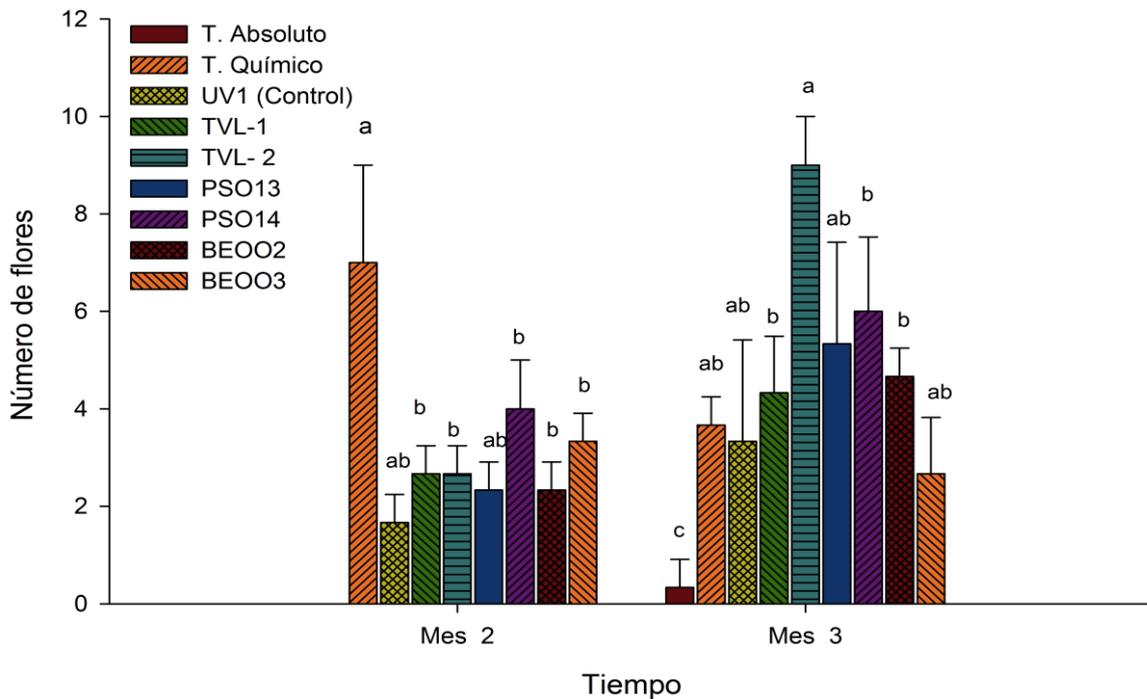


Figura 7. Número de flores (var. Sofía) por planta. Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$)

Con respecto al número de frutos (Fig. 8) los resultados evidenciaron diferencias significativas entre la fertilización biológica y la química con respecto al control absoluto, lo cual evidenció un efecto positivo ejercido por la presencia de los microorganismos. En particular en el tercer mes de muestreo las cepas TVL-2 y PSO14 superaron en 8.7% y 6.2% al testigo químico, respectivamente. Mientras que el resto de los tratamientos microbianos no presentaron diferencias significativas con el control químico (Fig. 8). Por lo tanto, se puede afirmar que la aplicación de las bacterias con cualidades promotoras de crecimiento vegetal tuvo una influencia significativa sobre el desarrollo vegetal, aún más mostró tener efectos importantes sobre el desarrollo vegetal observado como un número

similar o mayor de frutos empleando tan solo la mitad de la fertilización química tradicional.

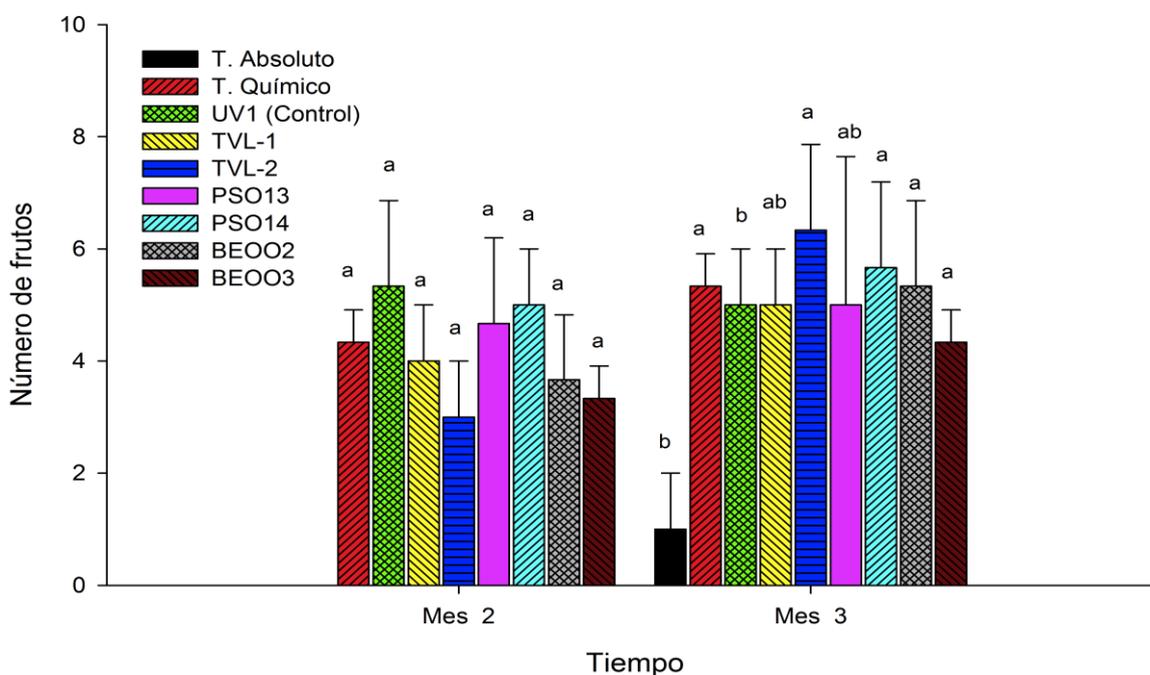


Figura 8. Número de frutos (var. Sofía) por planta. Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$)

Los microorganismos evaluados presentaron la capacidad para producir auxinas, las cuales son sustancias con un efecto regulador sobre el crecimiento de la planta, estando íntimamente relacionado con los procesos de fructificación de las plantas (Srivastava y Handa, 2005). Por tanto, es posible afirmar que la inoculación con las bacterias favorecieron la producción de frutos, teniendo en cuenta que las cepas TVL-2 y PSO14 presentaron producción de AIA. De igual manera, a pesar que la fertilización química fue menor la no aparición de diferencias significativas en el número de frutos evidencia el hecho que no hubo una deficiencia nutricional. Por tanto, la inoculación con estos microorganismos promotores de crecimiento vegetal representa una alternativa limpia y segura para

asegurar la fertilización de los cultivos sin incurrir en los costos ambientales y económicos de la fertilización química tradicional.

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que la inoculación de las plantas de tomate con las cepas TVL-2 y PSO14 exhibe un gran potencial para estimular el crecimiento y la producción de este cultivo. El uso de este tipo de bacterias, pueden ser una alternativa prometedora como biofertilizantes para el cultivo de tomate y la producción en la agricultura sostenible teniendo en cuenta que disminuiría el impacto sobre el medio ambiente al reducir el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química.

De igual forma, se podrán reducir los costos de producción, pues los hallazgos en las pruebas *in vitro* donde las dos bacterias señaladas exhibieron los índices más altos en la producción de compuestos tipo índoles que han sido ampliamente reportado por favorecer el desarrollo de la planta (Badri *et al.*, 2009; Tamaguchi *et al.*, 2006), así como las pruebas bajo condiciones de invernadero, señalan de manera notoria un aumento en las variables agronómicas evaluadas. Varios autores (Tamaguchi *et al.*, 2016; Beneduzi *et al.*, 2008; Egamberdiyeva, 2007; Shoebitz *et al.*, 2009) han reportado la capacidad productora índoles, sideróforos y solubilización de fósforo para promover el crecimiento de las plantas incluso la presencias de estrés abióticos (Ma *et al.*, 2011).

Los microorganismos evaluados presentan la capacidad de producir AIA, regulador del crecimiento que está íntimamente relacionado con los procesos de fructificación de las plantas (Srivastava y Handa, 2005). Por tanto, es posible afirmar que la inoculación con las bacterias favorecieran la producción de frutos, teniendo en cuenta que las cepas TVL-2 y PSO14 presentaron producción de AIA.

Conclusiones

El uso de bacterias caracterizadas por sus capacidades de promover el crecimiento vegetal generó en este estudio un efecto positivo sobre el crecimiento y producción del cultivo del tomate. Se identificaron dos cepas de ***Enterobacter sp.*** aisladas del mismo cultivo con base en su características microscópicas, macroscópicas, pruebas bioquímicas y su identidad molecular mediante secuenciación del fragmento 16S rDNA. Adicionalmente evaluó dos cepas pertenecientes al género ***Pseudomonas*** y dos de ***Bacillus***. Se observó que las bacterias evaluadas tuvieron algunas de las características asociadas a promoción de crecimiento vegetal ***in vitro*** (solubilización de fósforo, actividad fosfatasa, síntesis de índoles, producción de sideróforos), evidenciando en invernadero un efecto positivo sobre el cultivo de tomate cuando fueron aplicadas con un 50% de fertilización química y se compararon tanto con el tratamiento no fertilizado como con el que lo fue completamente. Estos hallazgos permiten concluir que los tratamientos que se dispusieron en el ensayo en invernadero proporcionan información valiosa acerca de diferentes alternativas para promover el crecimiento de los cultivos sin incurrir en mayores costos económicos y ambientales. No obstante, se considera que debe haber más investigación para lograr establecer planes adecuados de fertilización tradicional que combinen el uso de la tradicional y el uso de bacterias con mayor potencial para la biofertilización de cultivos de interés en nuestro país.

Recomendaciones

- Identificar los ácidos orgánicos producidos por cada especie bacteriana presentes en este estudio.
- Determinar la identidad de la especie de la cepa TVL-2 mediante la ampliación y secuenciación de otros genes.
- Evaluar las cepas TVL-2 y PSO14 en condiciones de campo; en cultivos de tomate.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.* 29:29-34.

Ali, B., Sabri, A., Ljung K., Hasnain, S. 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus spp.* and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J Microbiol Biotechnol* 25:519-526.

Andrews, J. and Harris, R. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol* 38: 145-180.

Antoun, H. and Prevost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui. Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer. Dordrecht. pp.1-38.

Ashrafuzzaman, M., Islam, M., Ismail, M., Shahidullah, S. and Hanafi, M. 2009. Evaluation of six aromatic rice varieties for yield and yield contributing characters. *Int. J. Agri. Biol.* 11: 616-620.

Babu-Khan, S., Yeo, T., Martin, W., Duron, M., Rogers, R. and Goldstein, A. 1995. Cloning of a mineral phosphate solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:972-978.

Badri, D., Weir, T., van der Lelie, D., Vivanco, J. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current opinion in biotechnology.* 20:642-650.

Bashan, Y. and Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30:1225-1228.

Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L., Bodanese-Zanettini, M., Passaglia, L. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*.39: 311-320.

Boopathi, E, Rao K. 1999. A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization. *Biochem Biophys Acta* 1435:30-40.

Caballero T., Camelo M., Bonilla R., Martínez M. 2007. Determinación de actividad fosfato solubilizadora por bacterias aisladas a partir de suelos algodoneros en los departamentos del César y Meta. *Suelos Ecuatoriales*. 37 :94-100.

Carcaño, M., Graciano, M., Ferrera.C., Pérez, M., Molina. G., Bashan, Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle TERRA.Latinoamericana.4(4): pp.493-502.

Chen, Y., Rekha, P., Arunshen A., Lai, W. and Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34:33-41.

Cohen J., Slovin J., Hendrickson A. 2003. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*.8: 197-199.

Condon, L; Turner, B; Cade-Menun, B. 2005. Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In J.T. Sims T, and A.N. Sharpley (eds.), *Phosphorus. Agriculture and the Environment*. American Society of Agronomy Monograph No.46. American Society of Agronomy. Madison.WI.pp.87-122.

Coney, M. 2000. *Microbiología del suelo. Un enfoque exploratorio*. Ed. Paraninfo. España.pg.416.

Córdova-Bautista, Y., Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Obrador-Olán, J., Córdova-Ávalo, V. 2009. Detection of beneficial bacteria in soils with banana (Musa AAA Simmonds) cultivar 'Gran enano' and its potential to prepare a biofertilizer. *Uciencias*. 25(3):253-265.

Cosgrove, D. 1967. Metabolism of organic phosphates in soil. McLaren AD, Peterson GH, editors. *Soil Biochemistry*. New York, USA7 Marcel Dekker.1: 216-28.

Cosgrove, D. 1980. Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology. Amsterdam. The Netherlands 7 Elsevier. Eivazi F. Tabatabai MA. Phosphatases in soils. *Soil Biol Biochem*. 9:167-72.

De Souza Nakagi, V. 2007. Caracterização da atividade da Fosfatase Ácida de *Penicillium implicatum*. Universidad de Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. 12 p.

Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Moñoz, J., González, F., Blázquez, M., Igual, J., Garcia-Balboa, C. 2008. Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy*. 92:124-129.

Dutta, D., Kundu, A., Chakraborty, M., Ojha, S., Chakrabarti, J., Chatterjee, N. 2006. Production and optimization of Fe(III) specific ligand, the siderophore of soil inhabiting and wood rotting fungi as deterrent to plant pathogens, *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* 41:237-248.

Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*. 36:184-189.

Encuesta Nacional Agropecuaria 2009. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – Corporación Colombia Internacional. Cálculos CCI. [en línea] <http://www.cci.org.co/ccinew/pdf/SEMBREMOS/JULIO%202010%20REVISTA%2013/produccion.pdf> [Consulta: mayo 12 2011].

Fallik, E., Okon, Y., Epstein E., Goldman, A. and Fischer, M. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. *Soil Biology & Biochemistry*. 20:45-49.

FAO. 2007. **FAOSTat** estadística database. **Agricultura. Cultivos primarios. Tomate.** [en línea]
<http://www.infoagro.gov.co/SEPSA/documentacion/informes/SintesisAnaliticaSA20180310.pdf> [Consulta: mayo 12 2011].

Fernández, M. 2007. Sobre los de la Caña de Azúcar, Red de Revistas Científicas de América Latina. *CIDCA*. El Caribe, Portugal, España. vol. 41, núm. 2, pg. 51-57.

Fiske, C., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375.

Gauggel, C. 2001. Diagnóstico Fincas Zona Bananera del Magdalena. División Colombia. pg. 35.

Glick, B. and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotech. Adv.* 15: 353-378.

Glick, B., Patten, C., Holguin, G. and Penrose, D. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College press. London. pp.270.

Glickman, E., Dessaux, Y. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowsky Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2):793-796.

Goldstein, A. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. *Biol. Agri. Hort.* 12:185-193.

Graetz, H. 2002. Suelos y Fertilización. 2002. pg. 125.

Gravel, V., Martinez, C., Antoun, H., Tweddell, R. 2006. Control of greenhouse tomato root rot [*Pythium ultimum*] in hydroponic systems. using plant-growth-promoting microorganisms. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 28:475-483.

Gunnarsson. N., Mortensen, U., Sosio, M., Nielsen, j. 2004. Identification of the enther – Doudoroff Pathway in an Antibiotic – Producing Actinomycetes Species. *Molecular Microbiology*.52(3):895-92.

Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M., Ouhdouch, Y. 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.*38:12-19.

Hariprasad, P., Niranjana, S. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* .316:13-24.

Ica concreta tres nuevos mercados para la exportación de productos agrícolas. [en línea] <http://www.ica.gov.co/Noticias/Pecuaria/2009/Ica-concreta-tres-nuevos-mercados-para-la-exportac.aspx> [Consulta: mayo 20 2011].

Igual, J., A. Valverde, A., Cervantes, E. and Velázquez, E. 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*. 21:561-568.

Jagadeesh, K. 2000. Selection of rhizobacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum* causing bacteria wilt in tomato and their biocontrol mechanisms. Ph. D. Thesis, Univ. of Agri. Sci., Dharwad (India).

Jain, P., and Patriquin, D.1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.*31: 206-210.

Jaramillo, J., Rodriguez, V., Guzman, M. and Zapata, M. 2007. Manual técnico buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Corpoica. Bogotá, Colombia. 314 p.

Jones, D., Dennis, P., Owen, A. and Van Hess, P. 2003. Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil*. 248: 31-41.

Kang, S., Hat, C., Lee, T. and Maheshwari, D. 2002. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. *Curr. Sci.* 82:439-442.

Khan, M., Zaidi, A. and Wani, P. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27:29-43.

Kirankumar, R., Jagadeesh, K., Krishnaraj, P., Patil, M. 2008. Enhanced growth promotion of tomato and nutrient uptake by plant growth promoting rhizobacterial isolates in presence of tobacco mosaic virus pathogen. *Karnataka J. Agric. Sci.* 21:309-311.

Kobayashi, Y., Mori, H., Sakagami, Y. 2010. Plant Hormones. *Comprehensive Natural Products II*. Chapter. 4(2):9-125.

Krishnaveni, M. 2010. Studies on Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils in Different Varieties of Foxtail Millet (*Setaria italica*) *International Journal of Agriculture and Food Science Technology* .1(1): 23-39.

kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W., Mendes, R., Geraldi, I., Pizzirani-kleiner, A. and Azevedo, J. 2004. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6:1244-1251.

Kumar-Mishra, R., Prakash, O., Alam, M., Dikshit, A. 2010. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. Herit.Recent Research in Science and Technology. 2(5):53-57.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol.63:541-556.

Ma, Y., Prasad, M., Rajkumar, M., Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnology Advances.29:248-258.

Mejía, M., Estrada, E. and Franco, M. 2007. Respuesta del tomate chonto cultivar Unapal Maravilla, a diferentes concentraciones de nutrientes, Acta Agronómica. Colombia. 56(2):75-83.

Mendoza H. 2006. Manejo de fertilizantes y abonos orgánicos. Campus Tabasco. Colegio de Postgraduados-Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. pg.211.

Miller, Jr. and Tyler, G. 2006. Ecología y Medio Ambiente. Iberoamericana. Bogotá. pg. 91, 113-115.

Neilands, J. and Leong, S. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. Annu. Rev. Plant Physiol. 37:187-208.

Omar, S. 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vascular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World J. Microbiol. Biotechnol. 14: 211-218.

Paredes, Z. 2009. Cultivo de tomate en invernadero. Corpoica. Colombia Cundinamarca. 56. p.

Park, J., Bolanab, N., Mallavarapuab, M and Naiduab, R. 2010. Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria.

19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World
Brisbane, Australia. Published on DVD. 66:1-6.

Patten, C., Glick, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3795-3801.

Pradhan, N. and Sukla, L. 2005. Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. *African J. Biotechnol.* 5:850-854.

Producción y zonas de producción de Fique. [en línea]
http://www.finagro.com.co/html/i_portals/index.php?p_origin=internal&p_name=content&p_id=MI-253&p_options=#COLOMBIA [Consulta: mayo 20 2011].

Quiquampoix, H., Mousain, D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS, editors. *Organic phosphorus in the Environment*. Wallingford, UK7 CAB International. pp. 89-112.

Reid, T., Wilson, I. 1971. E Coli alkaline phosphatase. Boyer PD, editor. *The enzymes*. New York, USA7 Academic Press. Vol (4) pp. 373-415.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R., Tanguay, P., Antoun, H. 1999. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 291-295.

Richardson, A. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:897-906.

Rodriguez, H., Gonzalez, T., Selman, G. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotechnol.* 84:155-161.

Rodríguez, S. 1982. Fertilizantes, nutrición vegetal. AGT Editor, S. A. México, D. F. pg.157.

Rodríguez, S. and Rodríguez, F. 2004. Protocolo Para la Extracción de ADN Modificado de IAEA. Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM). Programa de Fisiología y Nutrición Animal. Corpoica Tibaitatá.

Rotenberg, D., Jiménez, A., Wells A; Chapman, E., Whitfield, A., Goodman. R. and Cooperband, L. 2007. Soil properties associated with organic matter-mediated suppression of bean root rot in field soil amended with fresh and composted paper mill residuals. *Soil Biol. Biochem.* 39:2936-2948.

Sagoe, C., Ando, T., Kouno, K. and Nagaoka, T. 1998 a. Effects of organic-acid treatment of phosphate rocks on the phosphorus availability to Italian ryegrass. *Soil Sci. Plant Nutr.*43:1067-1072.

Salgado, G., Palma, D., Núñez, R., Lagunes, E., Debernardi, de la V. and Mendoza, H. 2006. Manejo de fertilizantes y abonos orgánicos. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados-Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 211 p.

Salisbury, F. 1994. Fisiología vegetal. Editorial. Iberoamericana. Mexico. Pg. 759.

Saraptka, B. 2003. Phosphatase activities (ACP, ALP) in agroecosystem soils. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Pp. 8-39.

Schwyn, B. and Neilands, J.1987. Universal chemical assays for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.*160:47-56.

Seshadri, S., Ignacimuthu, S. and Lakshminarsimhan, C. 2002. Variation of heterotrophic and phosphate solubilizing bacteria from Chennai. Southeast coast of India. *Indian Journal of Marine Sciences.* 31:69-72.

Shoebitz, M., Ribaudó, C., Pardo, M., Cantore, M., Ciampi, L., Curá, J. 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*.41:1768 -1774.

Sistema de información de la oferta agropecuaria encuesta nacional agropecuaria 2007. [en línea]

http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/ENA/ENA_2007.pdf [Consulta: mayo 9 2011].

Son, H., Park, G., Cha, M., Heo, M. 2005 Solubilization of insoluble inorganic phosphate by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour. Technol.* 97:204-210.

Srivastava, A., Handa, A. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation.* 24: 6-82.

Stevenson, F. 1967. Organic acids in soil. *In:* A. D. McLaren and G. H. Peterson. (eds). *Soil biochemistry.* Marcel Dekker. New York, NY, USA. Pp. 119-146.

Tabatabai, M. And Bremner, M. 1969. Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*1:301-307.

Taiz, L and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology.* Sinauer Associates, Inc.

Tamaguchi, I., Cohen, J., Culler, A., Quint, M., Slovin, J., Nakaima, M., Tarnawski, S., Hamelin, J., Jossi, M., Aragno, M., Fromin, N. 2006. Phenotypic structure of *Pseudomonas* populations is altered under elevated pCO₂ in the rhizosphere of perennial grasses. *Soil Biology and Biochemistry* 38:1193 -1201.

Terán, C., Valenzuela, M., Villanada, E., Sánchez, G. and Hío, P. 2007. Manejo de riego y fertilización en tomate bajo cubierta en la sabana de Bogotá. Colombia, Cundinamarca. Corpoica. 88 p.

Tien, T., Gaskins, M. and Hubbell, D. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol.37:1016-1024.

Turner, B. and Haygarth, P. 2005. Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. Science of the Total Environment. 344:27-36.

Vassilev, N., Medina, A., Vassileva, M. 2006. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. Plant Soil.287:77-84.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. and Vassilev, N. 1999. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. Bioresour Technol. 67:229-232.

Wani, P., Khan, M., Zaidi, A. 2007. Chromium reduction, plant growth-promoting potentials and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. Curr. Microbiol. 54:237-243.

Whipps, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany.52:487-511.

Whitelaw, M. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Adv. Agron.69:99-151.

Yamaguchi, S., Sakakibara, H., Kuroha, T., Hirai, N., Yokota, T., Ohta, H., Kobayashi, Y., Mori, H and Sakagami, Y 2010. Plant Hormones, In Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology; Mander L, Lui HW, Eds., Elsevier. Oxford.4:9-125.

Yu, X., Liu, X., Zhu, T., Liu, H; Mao, C. 2011. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. Biol Fertil Soils .47:43-446.

ANEXOS

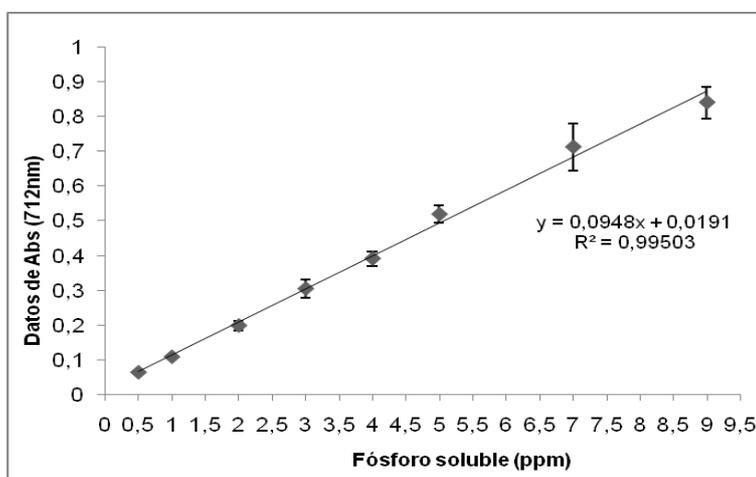
Anexo 1. Composición química de la Roca Fosfórica “Fosforita de pesca”

Composición química de Fosforita de pesca 30%	
Fósforo Total (%P ₂ O ₅)	30%
Fósforo Asimilable (%P ₂ O ₅)	4%
Fósforo de Lenta Asimilación (%P ₂ O ₅)	26%
Calcio	40%
Silicio	12%
Magnesio	0.1%
Manganeso	40ppm
Cobre	30ppm
Molibdeno	10ppm
Zinc	300ppm
Humedad	3%

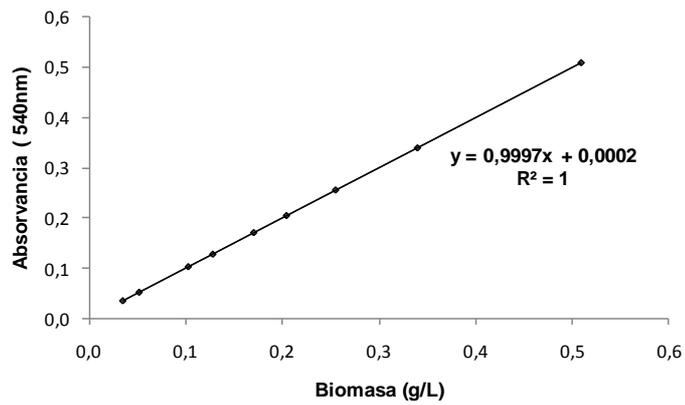
Fuente: www.fosfatosdeboyaca.com, 2009.

Anexo 2. Curva patrón para determinación de P soluble con técnica fosfatomoliddeno

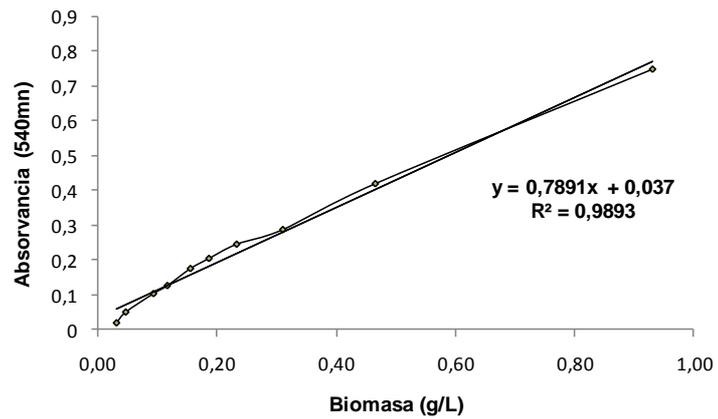
Concentración de P disponible (ppm)	Absorbancia (712 nm)
0,5	0,064
1	0,109
2	0,198
3	0,305
4	0,391
5	0,519
7	0,712
9	0,840



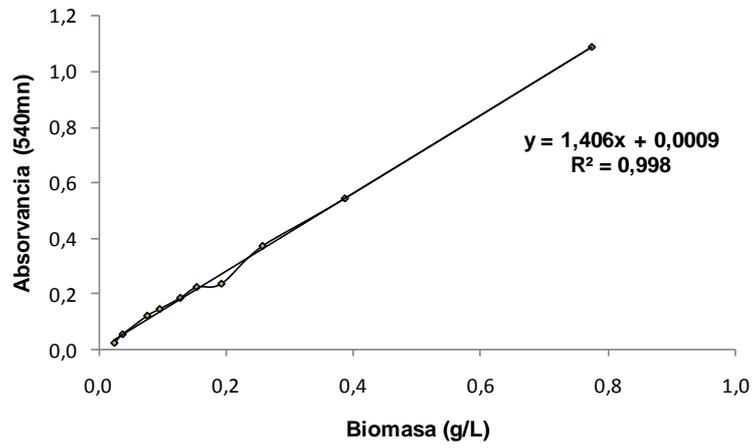
Anexo 3. Curva de peso seco Ceba TVL-1



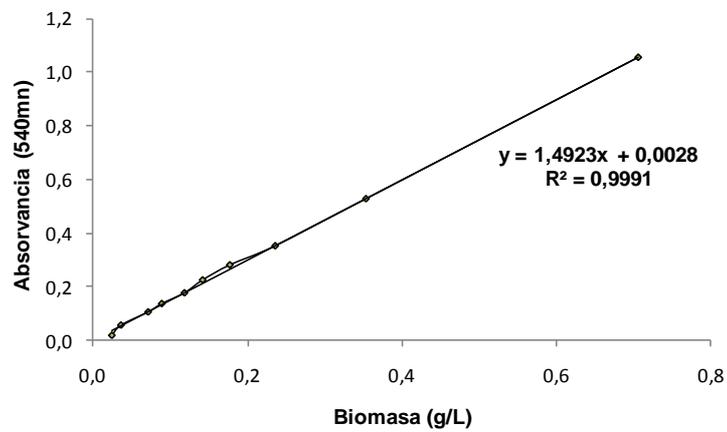
Anexo 4. Curva de peso seco Ceba TVL-2.



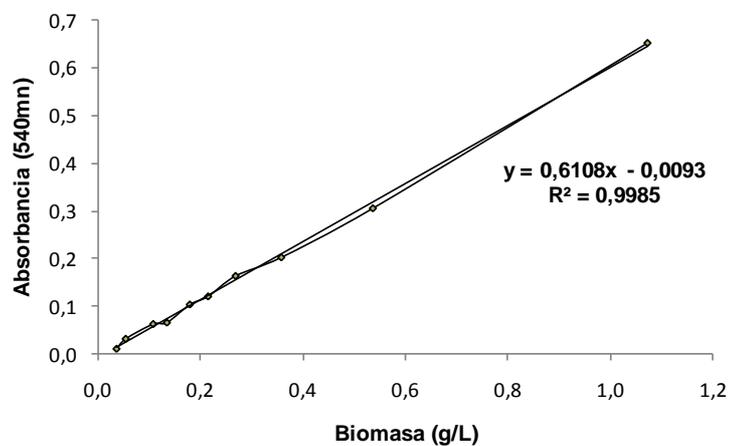
Anexo 5. Curva de peso seco cepa PSO13



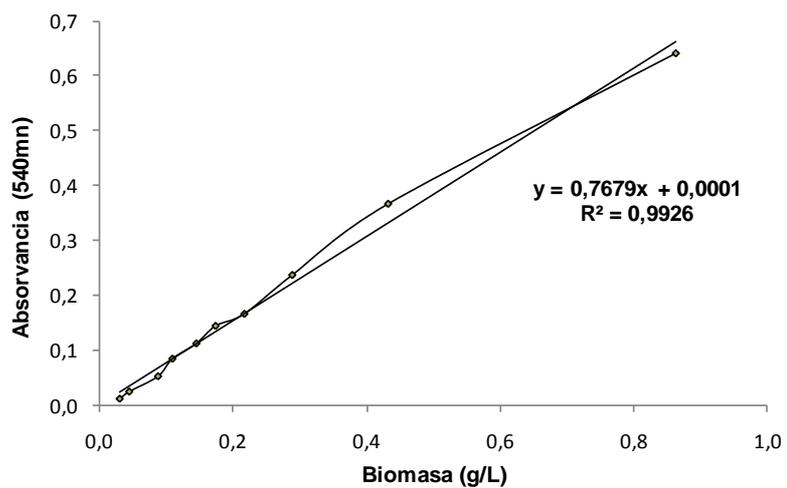
Anexo 6 . Curva de peso seco cepa PSO14



Anexo 7. Curva de peso seco cepa BEOO2

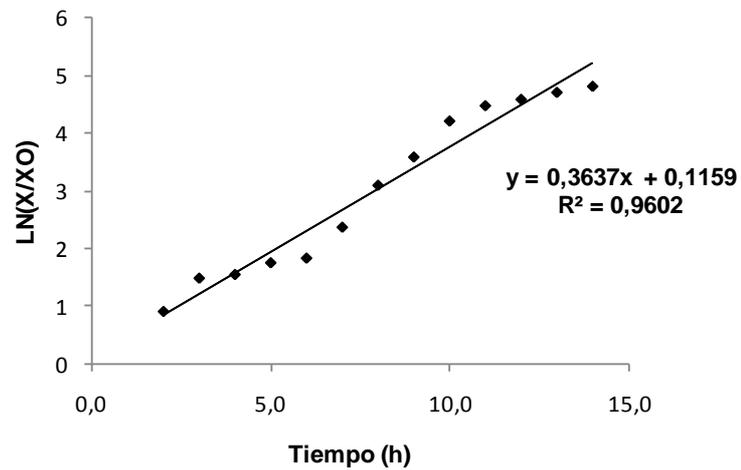
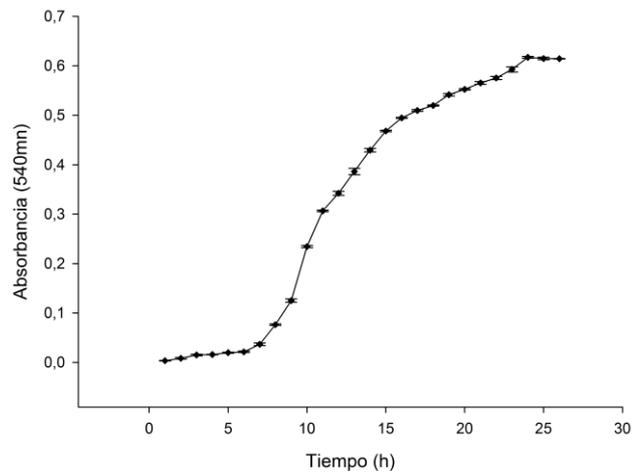


Anexo 8. Curva de peso seco cepa BEOO3



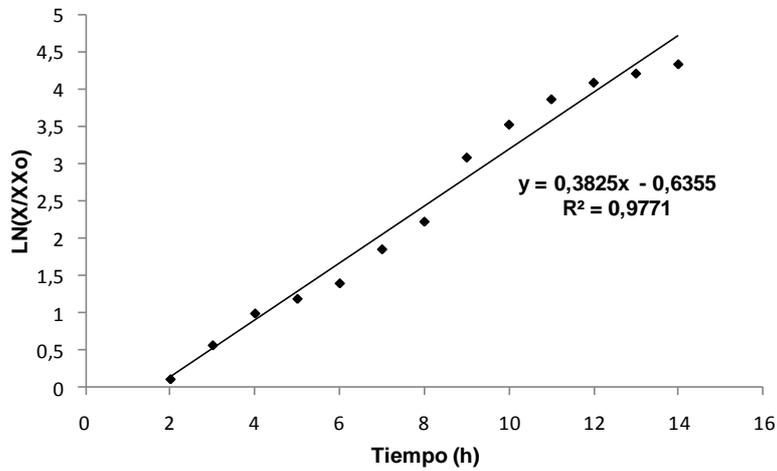
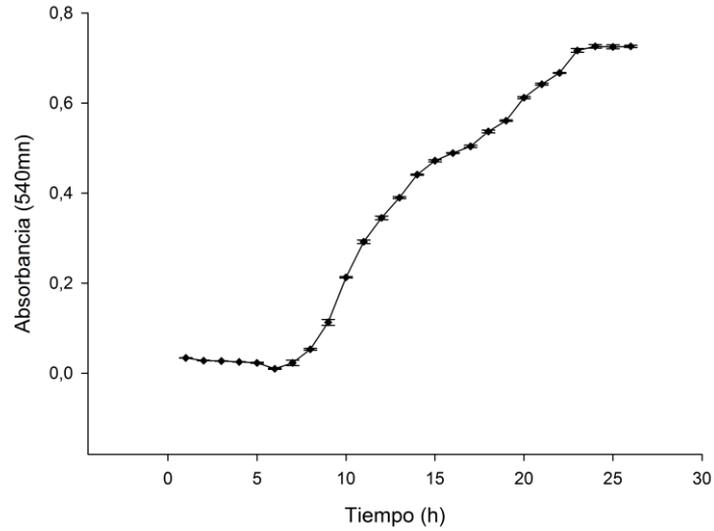
Curva de peso seco BEOO3

Anexo 9. Cinética preliminar de la cepa bacteriana TVL-1



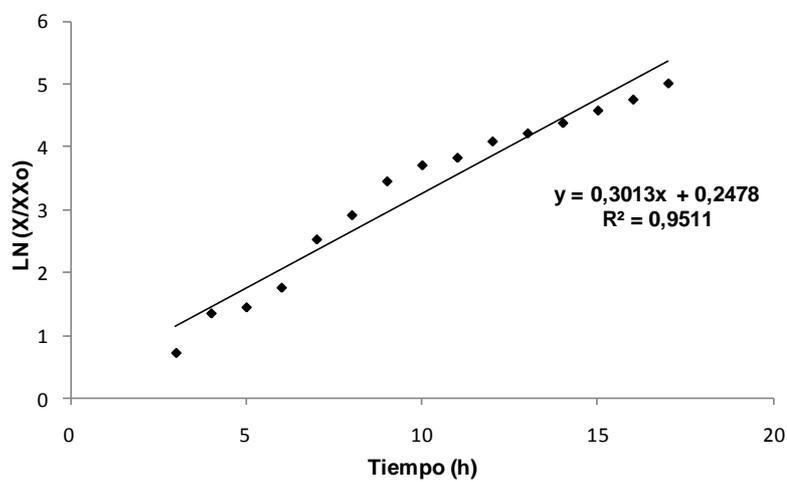
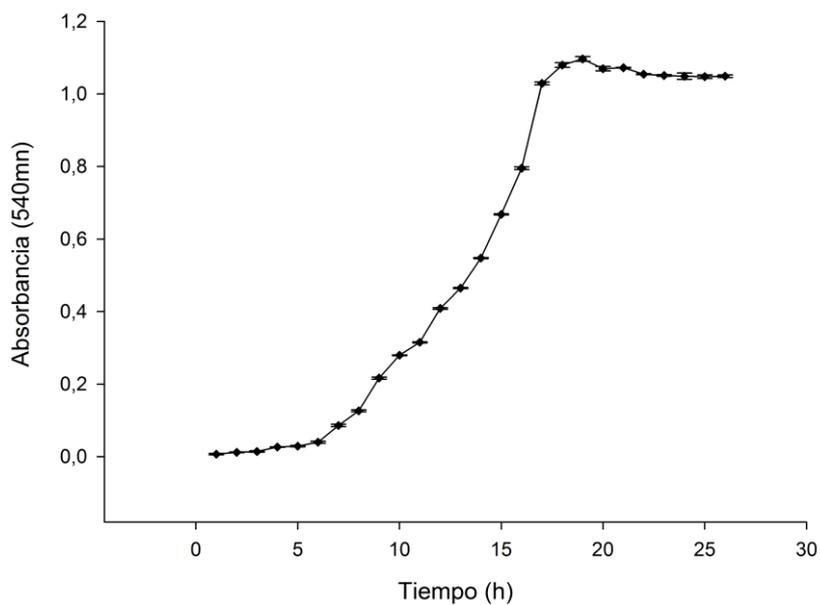
Cepa TVL-1. Tiempovs. LN(X/X₀) y ecuación de regresión lineal. Donde X₀ representa el valor inicial biomasa y X la medición de la biomasa en tiempo.

Anexo 10. Cinética preliminar de la cepa bacteriana TVL-2



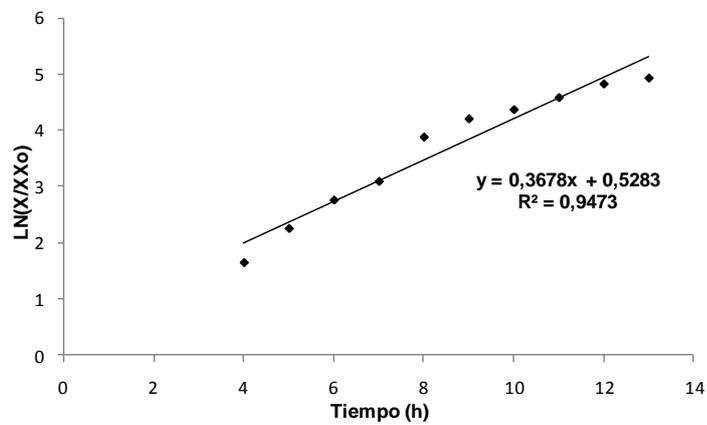
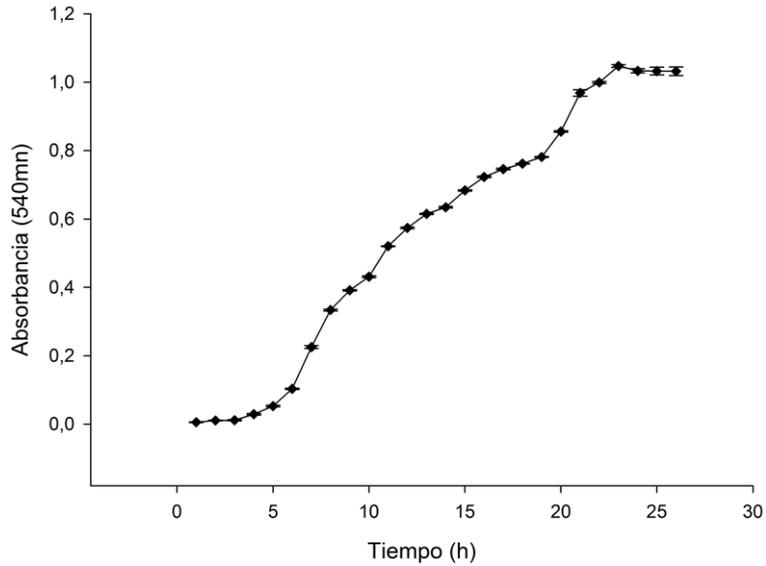
Cepa TVL-2. Tiempovs. LN(X/XXo) y ecuación de regresión lineal. Donde Xo representa el valor inicial biomasa y X la medición de la biomasa en tiempo.

Anexo 11. Cinética preliminar de la cepa bacteriana PSO13



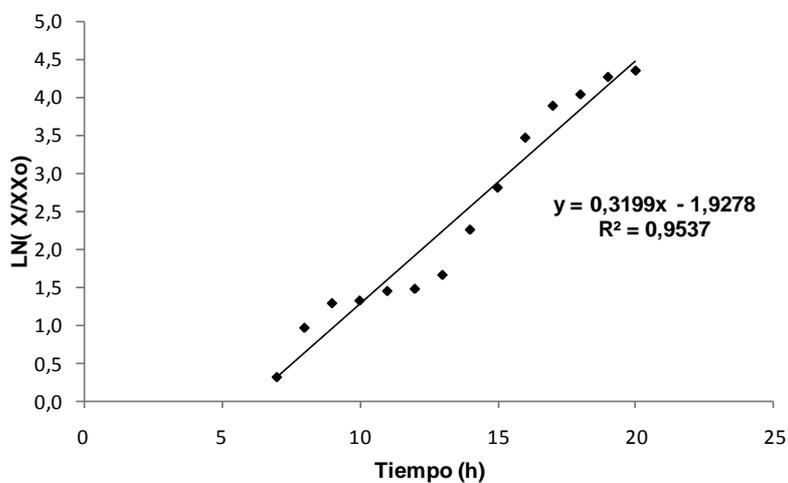
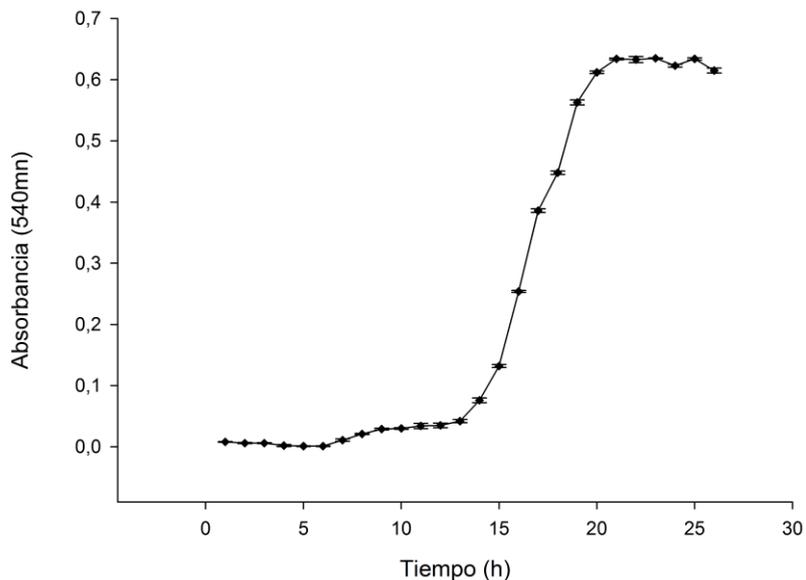
Cepa PSO13. Tiempovs. LN(X/XXo) y ecuación de regresión lineal. Donde X_o representa el valor inicial biomasa y X la medición de la biomasa en tiempo.

Anexo 12. Cinética preliminar de la cepa bacteriana PSO14



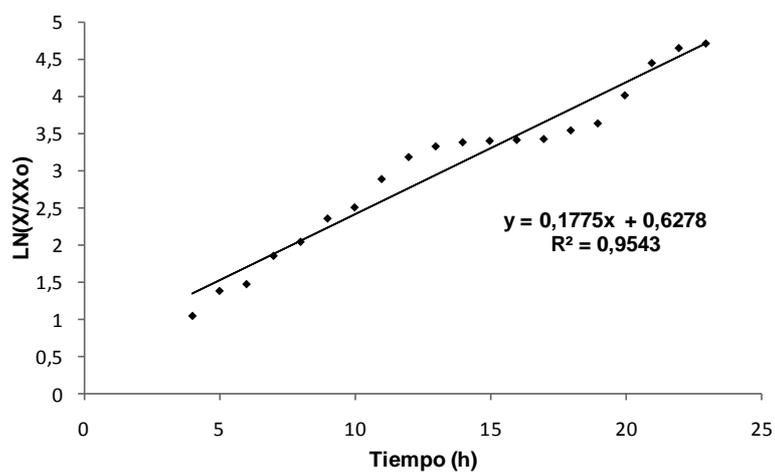
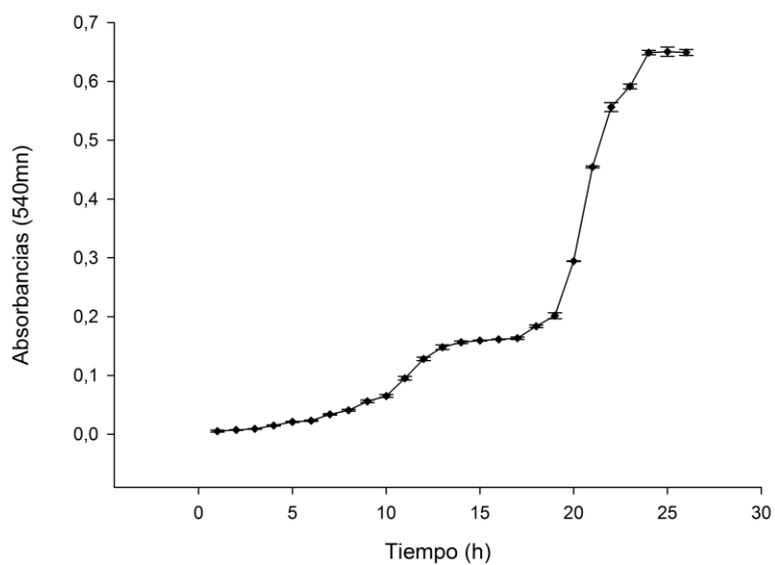
Cepa PSO14. Tiempovs. LN(X/XXo) y ecuación de regresión lineal. Donde X_o representa el valor inicial biomasa y X la medición de la biomasa en tiempo.

Anexo 13. Cinética preliminar de la cepa bacteriana BEOO2



Cepa BEOO2. Tiempovs. LN(X/XXo) y ecuación de regresión lineal. Donde Xo representa el valor inicial biomasa y X la medición de la biomasa en tiempo.

Anexo 14. Cinética preliminar de la cepa bacteriana BEOO3



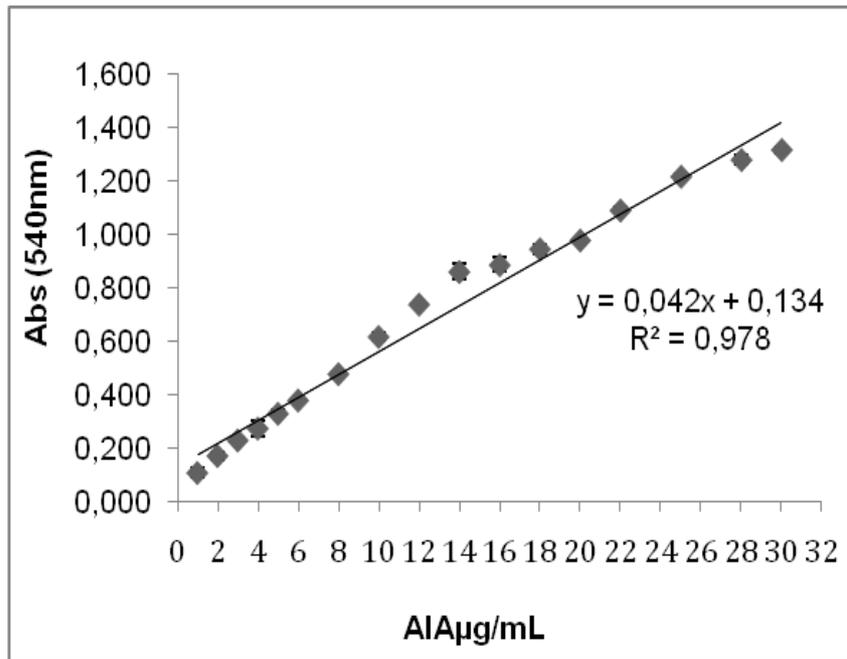
Cepa BEOO3Tiempovs. $\ln(X/X_0)$ y ecuación de regresión lineal. Donde X_0 representa el valor inicial biomasa y X la medición de la biomasa en tiempo.

Anexo 15. Curva patrón de p-nitrofenil fosfato para determinación de Actividad enzimática

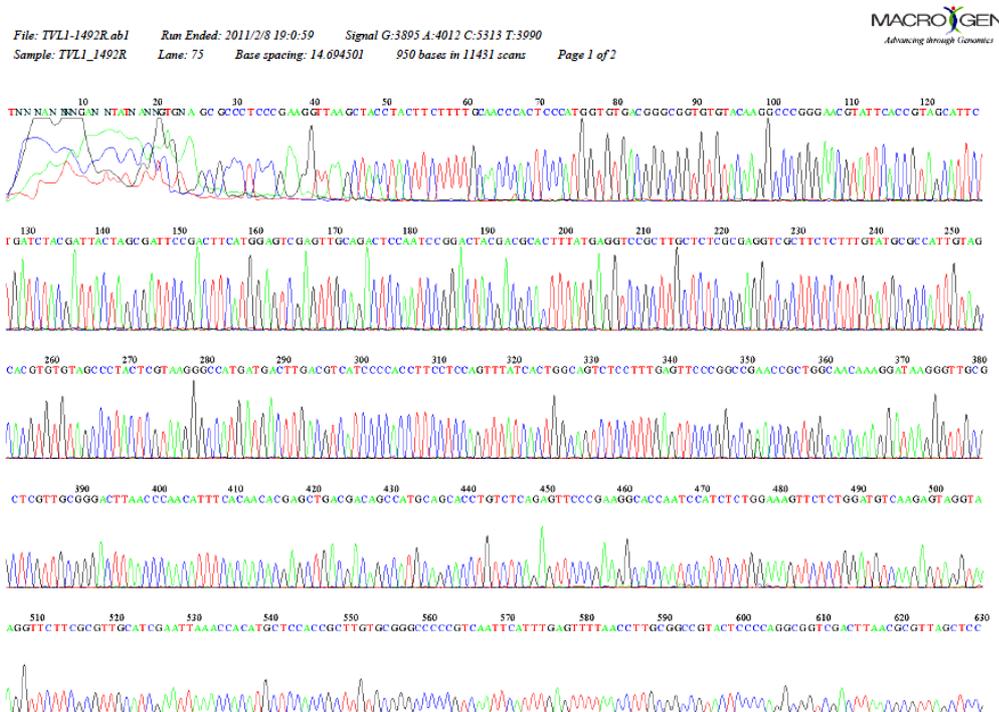
Concentración (nM)	Absorbancia (450 nm)
1	0,259
0,9	0,241
0,8	0,226
0,7	0,196
0,6	0,168
0,5	0,154
0,4	0,122
0,3	0,102
0,2	0,080
0,1	0,034

Anexo 16. Curva patrón para determinación de Índoles Totales

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (540 nm)
1	0,108
2	0,171
3	0,229
4	0,274
5	0,329
6	0,379
8	0,478
10	0,617
12	0,738
14	0,860
16	0,886
18	0,946
20	0,978
22	1,091
25	1,217
28	1,280
30	1,317



Anexo 17. Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S con el primer 1942R de la cepa TVL-1



Anexo 18. Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S con el primer 1942R de la cepa TVL-2

