

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL DE DOS CEPAS
NATIVAS DE *Azotobacter* sp EN PLANTAS DE TOMATE BAJO INVERNADERO**



María Camila Herrera Gutiérrez
María Andrea Millán Arboleda

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
2018

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL DE DOS CEPAS
NATIVAS DE *Azotobacter* sp EN PLANTAS DE TOMATE BAJO INVERNADERO**

María Camila Herrera Gutiérrez

María Andrea Millán Arboleda

José Salvador Montaña, PhD
Director

María Ximena Rodríguez, PhD
Evaluador

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
2018

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se 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”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a Dios por guiarnos y llenarnos de fortaleza a través del camino. Por ser luz en nuestras vidas y permitirnos culminar satisfactoriamente nuestro trabajo de grado. De igual manera queremos agradecer a nuestros padres: Rocío y Richar; y Giovanna y Andrés, por su apoyo incondicional, por ser el pilar más importante en nuestras vidas, por confiar y creer en nuestras expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

A nuestro tutor José Salvador Montaña, por su amabilidad, motivación, paciencia, experiencia y amplio conocimiento aportado a este trabajo.

Por último, agradecemos a nuestros amigos con quienes compartimos dentro y fuera de clases. Por su apoyo moral, por ayudarnos desinteresadamente a permanecer con empeño y dedicación.

Tabla de contenido	
Resumen	9
1. Introducción	10
2. Formulación del problema y justificación.....	11
2.1. Formulación del problema.....	11
2.2. Justificación	11
3. Marco teórico	12
3.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	12
3.1.1 <i>Azotobacter</i> spp.	13
3.2. Modelos vegetales para evaluación de potencial PGPR	14
3.3. Biofertilizantes.....	16
3.3.1. <i>Azotobacter</i> como biofertilizante.....	16
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos.....	18
5. Metodología.....	18
5.1. Microorganismos	18
5.2. Material vegetal	18
5.3. Reactivación de cepas de <i>Azotobacter</i>	19
5.4. Preparación de inóculo.....	19
5.5. Curva de crecimiento	19
5.6. Inoculación de semillas	19
5.7. Pruebas de germinación.....	19
5.8. Trasplante de material vegetal	20
5.9 Evaluación del crecimiento	20
5.10. Análisis estadístico	21
6. Resultados	22
6.1. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Azotobacter</i> C4T y C2Br	22
6.2 Porcentaje de germinación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de semillas de tomate	23
6.3-Pruebas en invernadero	26
7. Discusión	34
7.1. Evaluación de cinéticas de crecimiento de cepas de <i>Azotobacter</i> sp (C4T y C2Br)	35
7.2 Evaluación del porcentaje de germinación	36
7.3 Evaluación de parámetros fisiológicos de crecimiento.....	37
7.3.1. Número de hojas.....	39
7.3.2. Longitud del tallo	38

7.3.3. Crecimiento de la raíz	40
7.3.4. Biomasa vegetal	40
Conclusiones	41
Referencias	42
ANEXOS	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Número de hojas de plantas de tomate en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.	27
Tabla 2. Longitud de la raíz de plantas de tomate en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.	28
Tabla 3. Longitud del tallo de plantas de tomate en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.	29
Tabla 4. Biomasa vegetal representada en peso fresco en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.	31
Tabla 5. Biomasa vegetal representada en peso seco en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.	32
Tabla 6. Biomasa vegetal representada en peso seco de la raíz en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.	34
Tabla 7. Biomasa vegetal representada en peso seco aéreo en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.	34

Índice de Figuras.

Figura 1. Curva de crecimiento de las cepas C4T y C2Br mediante espectrofotometría a 540 nm	22
Figura 2. Cinética de orden 1 de la cepa C4T y C2Br en su fase logarítmica	23
Figura 3. Germinación de semillas de tomate en condiciones in vitro.	244
Figura 4. Siembra en semilleros bajo condiciones de invernadero.	24
Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas de tomate en condiciones in vivo (19 días) e in vitro (10 días)	25
Figura 6. Registro de la temperatura máxima, mínima y humedad relativa en el invernadero, durante el periodo de experimentación.....	26
Figura 7. Apariencia de las hojas a las 8 semanas de evaluación.....	27
Figura 8. Apariencia de las plantas de tomate Después de 8 semanas.....	29
Figura 9. Parámetros fisiológicos de crecimiento vegetal.....	30
Figura 10. Parámetros fisiológicos de crecimiento vegetal.....	33

Resumen

El crecimiento vegetal adecuado es de gran importancia en el sector agrícola, garantizando mayor productividad de los cultivos. Es habitual en los sistemas agrícolas implementar procesos de fertilización orgánica o inorgánica, que provean macro y micronutrientes requeridos para el buen desarrollo de la planta. Sin embargo, el uso indiscriminado de fertilizantes químicos conlleva a la acidificación, erosión y alteración de las propiedades fisicoquímicas del suelo. Se han identificado microorganismos capaces de establecer interacciones positivas con las plantas, permitiendo promover su crecimiento mejorando la calidad de los frutos a cosechar. Los géneros bacterianos más estudiados por ser rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), por sus siglas en inglés, son *Azospirillum* sp., *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* y algunas especies de *Bacillus* sp. Trabajos realizados por la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) de la Pontificia Universidad Javeriana, con aislamientos de *Azotobacter* sp. obtenidos de suelos de cultivos hortícolas colombianos, han demostrado el potencial de este género bacteriano para producir metabolitos promotores de crecimiento vegetal. En este trabajo, se propuso evaluar la actividad promotora del crecimiento vegetal de dos cepas nativas de *Azotobacter* sp. en plantas de tomate de la variedad Chonto Santa Clara. Para esto, se reactivaron las cepas de *Azotobacter* sp. C4T y C2Br, se estableció la curva de crecimiento y condiciones de producción del inóculo. Se determinó que las cepas obtuvieron tiempos de duplicación de 77,8 y 10,8 horas respectivamente y fases de crecimiento exponencial hasta las 41 horas. Posteriormente se evaluó efecto de las dos cepas sobre la germinación de semillas de tomate, bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*. Se obtuvieron porcentajes de germinación de máximos de 82.22% para la cepa C4T y 80% para C2Br. Finalmente, se evaluó el efecto de las dos cepas de *Azotobacter* sp. sobre el crecimiento de plantas de tomate bajo condiciones de invernadero mostrando resultados significativamente positivos con respecto a las plantas control. Los resultados de este trabajo, sumado a los obtenidos en trabajos anteriores desarrollados por UNIDIA, permiten sugerir que las dos cepas de *Azotobacter* evaluadas son promisorias para ser empleadas como biofertilizante.

1. Introducción

En el sector agrícola, el crecimiento vegetal adecuado es de gran importancia ya que garantiza un mayor nivel de producción. Para mantener o incrementar la productividad de los cultivos, es necesario implementar de procesos de fertilización y control de plagas y enfermedades. La aplicación de fertilizantes químicos u orgánicos, que suplen al suelo con macro y micronutrientes requeridos para el buen desarrollo de la planta es una práctica habitual en los sistemas agrícolas. Sin embargo, los elevados costos de los fertilizantes frecuentemente usados en agricultura (urea, cloruro de potasio y fosfato de amonio), los problemas ambientales asociados a su uso excesivo, sumado a la presencia de patógenos que generan pérdidas importantes en la productividad para los cuales no han desarrollado estrategias de control químico efectivo, han promovido la aplicación de productos alternativos dentro de los que se incluyen los biofertilizantes.

Los biofertilizantes corresponden a insumos formulados con uno o varios microorganismos, que de una u otra forma proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos y cuyo uso permite reducir los costos de producción, proteger el medio ambiente y conservar la fertilidad y biodiversidad del suelo. Las bacterias de la rizósfera que poseen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, se conocen como rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR por su sigla en inglés) (1), *Azotobacter* es uno de los géneros bacterianos reportado como PGPR y ampliamente utilizado como biofertilizante en varios cultivos. La mayoría de especies de *Azotobacter* basan su actividad PGPR en la producción de reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), fijación no simbiótica de nitrógeno y solubilización de fósforo entre otras. Estas características, facilitan la asimilación y absorción de nutrientes disponibles en el suelo. De acuerdo con lo anterior, este estudio, tiene como finalidad evaluar la actividad promotora de crecimiento vegetal *in-vivo*, de dos cepas nativas de *Azotobacter* sp. con el fin de generar conocimiento que permita proponer su uso como biofertilizante. El trabajo propuesto está enmarcado en un proyecto que viene desarrollando la Unidad de Investigaciones Agropecuarias UNIDIA en la línea de Investigación “estudio de microorganismos con potencial agropecuario”, y cuyo objetivo principal es evaluar la actividad PGPR en aislamientos nativos de *Azotobacter* provenientes de cultivos hortícolas del altiplano Cundiboyacense.

2. Formulación del problema y justificación

2.1. Formulación del problema

Colombia es un país con un alto potencial agrícola, sin embargo, desde hace más de una década se ha observado disminución de productividad, pérdida de competitividad y aumento de la dependencia del uso de agroquímicos. La deficiencia de elementos minerales en el suelo o su baja disponibilidad, afecta gravemente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para solucionar este problema, desde el siglo pasado, se han implementado métodos de fertilización química, que aun cuando son benéficos para la planta, su uso excesivo, causa acidificación del suelo, favorecen la erosión, alteran las propiedades físico-químicas del suelo y contaminan los cuerpos de agua (2,3).

2.2. Justificación

Debido a la pérdida de la fertilidad del suelo como consecuencia del uso indiscriminado de fertilizantes químicos, se ha generado la necesidad de implementar alternativas de fertilización, con el fin de recuperar las características del suelo, aumentar los ingresos al agricultor y mejorar la eficiencia del cultivo (4) Según el DANE (5) solo en enero de 2018 Colombia exportó 380.547 toneladas métricas de productos agrícolas alimenticios, lo que indica que las especies hortícolas juegan un papel importante dentro de la economía nacional, ya que son productos de alta demanda alimenticia en la población, y un área generadora de empleo en el campo y la industria agrícola (6). Por ello, es importante el uso de biofertilizantes en la actividad agrícola, los cuales representan alternativas económicamente viables, garantizando producciones más limpias para el sector agrícola (7).

El uso de biofertilizantes a base de microorganismos (bacterias, hongos), ha logrado mayores rendimientos rentables y económicos ya que buscan estimular los ciclos biológicos naturales (8). Los microorganismos empleados en estos productos, son aquellos capaces de fijar nitrógeno libremente, solubilizar el fósforo y producir reguladores de crecimiento vegetal (9). Se encuentra documentado que los microorganismos establecen interacciones positivas con las plantas, con el fin de promover su crecimiento y optimizar la calidad de los frutos a cosechar, entre estos microorganismos se encuentran bacterias de los géneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y algunas especies de *Bacillus* ((10), y hongos como *Aspergillus* (11), *Trichoderma* (12,13), *Pisolithus tinctorius* (14) y *Penicillium* sp (15), entre otros.

La actividad PGPR de *Azotobacter* spp. se basa en la capacidad para producir agentes quelantes de hierro, fijar libremente nitrógeno y producir ácido indol acético, entre otras (16,17). Con base en lo descrito anteriormente, este estudio tiene como finalidad evaluar la actividad promotora de crecimiento vegetal *in-vivo* en plantas de tomate, de dos cepas nativas de *Azotobacter* sp. con la intención de proponer su posible uso como biofertilizante y de esta manera motivar a los agricultores a disminuir el uso de fertilizantes químicos.

3. Marco teórico

3.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) son bacterias que se pueden aislar de las superficies de la raíz de las plantas y en la rizósfera, las cuales tienen potencial para mejorar el crecimiento de las plantas directa o indirectamente (18). Estas bacterias tienen la capacidad de modificar o mejorar factores que afectan a las plantas por distintos mecanismos. Un ejemplo de esto es la producción de fitohormonas como lo las auxinas, que tienen un efecto directo sobre el crecimiento de la planta al controlar distintas etapas del crecimiento y desarrollo vegetal, como alargamiento celular, división celular y diferenciación tisular (19).

La solubilización de fosfatos inorgánicos, el aumento de la asimilación del hierro a través de la producción de sideróforos y los compuestos volátiles que afectan las vías de señalización de la planta (20) son otras de las características que tiene una bacteria promotora del crecimiento vegetal. Por tratarse de mecanismos indirectos, tienen la capacidad de defender a la planta frente al ataque de agentes patógenos, bien sea por interacciones antagónicas con otros microorganismos o por inducción de resistencia por parte de la planta (21). Debido a esto, el uso de compuestos que promueven el crecimiento vegetal se ha incrementado en el campo agrícola con el fin de aumentar la productividad de los cultivos, tener cosechas de mejor calidad de forma sostenible y reducir el impacto ambiental generado por la aplicación de agroquímicos.

Hoy en día se busca la incorporación de sustancias promotoras del crecimiento vegetal mediante procesos biológicos, es decir, que sean sintetizadas por microorganismos para incluirlas en los actuales esquemas de fertilización. Los géneros bacterianos más

estudiados y con mayor potencial para ser utilizados en la síntesis de dichos compuestos son: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, entre otros (22).

Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen la capacidad de potenciar el crecimiento de las plantas, mediante mecanismos directos o indirectos (23). Se ha reportado que la fijación del 20% del nitrógeno atmosférico está atribuida a este microorganismo (24), igualmente para realizar el secuestro de hierro, *Pseudomonas* spp. producen sideróforos fluorescentes de tipo pyoverdine y dihydropyridine (25). Además de producir reguladores del crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno) involucrados de manera efectiva en la elongación de las plantas (26).

De otra parte, algunas especies del género *Azospirillum*, inducen cambios en los parámetros de crecimiento vegetal entre los que se encuentran aceleración de la germinación de las semillas, aumento de la biomasa aérea de la planta, aumento peso seco de la raíz y desarrollo del sistema radical de las plantas (27). La capacidad de fijar el nitrógeno de forma libre es una de sus principales características. Por su parte, a las bacterias del género *Rhizobium* spp se atribuye la mayor parte de nitrógeno fijado en plantas leguminosas mediado bajo la asociación simbiótica entre ellos, reduciendo sustancialmente el requerimiento de Nitrógeno de fuentes externas (28), en cuanto a la solubilización del fósforo especies de *Rhizobium* sintetizan ácidos orgánicos de bajo peso molecular que actúan sobre el fósforo inorgánico haciendo de este un elemento disponible y asimilable por las plantas (29). Igualmente, *Azotobacter* ha demostrado promover el crecimiento vegetal de distintos cultivos, bajo condiciones ambientales diversas y tipos de suelo variados.

3.1.1 *Azotobacter* spp.

Se han identificado varias especies de *Azotobacter* con capacidad de promover el crecimiento vegetal. Las más estudiadas corresponden a las especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. paspali* y *A. beijerinckii*, cada una con un amplio potencial PGPR, lo que facilita su uso en diversos tipos de suelo y cultivos (30).

Azotobacter sp. a sido un microorganismo utilizado extensamente en la producción agrícola mundial, ya que le aportan a las plantas hasta el 50 % de sus necesidades de nitrógeno

mediante la fijación asociativa del elemento que llevan a cabo a partir de la atmósfera, además de suministrarles sustancias activas estimuladoras del desarrollo vegetal (30).

Posee capacidad diazotrofa, es decir puede convertir el nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_4) mediante la acción de la enzima nitrogenasa. Igualmente sintetiza sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como, vitaminas y hormonas vegetales que intervienen directamente con el desarrollo de la planta. Sintetiza tiamina de 50-100 mg g⁻¹ de peso seco; ácido nicotínico de 200-600 mg g⁻¹ de y ácido pantoténico y biotina; ácido indolacético; ácido giberélico y citoquinas (30).

Se han reportado estudios donde tras la caracterización de *Azotobacter* como PGPR se confirma su capacidad de producir Ácido indol acético, donde además de producirlo se aumenta progresivamente con el tiempo de 12,63 µg ml⁻¹ a 14.95 µg ml⁻¹. También se reportó una buena actividad de fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo (30).

Azotobacter spp. son capaces de ejercer todas sus funciones de promoción del crecimiento vegetal en condiciones de estrés. Se encuentra reportado, por ejemplo, que *Azotobacter chroococcum*, tiene la capacidad de resistir niveles elevados de metales pesados en el suelo en cultivos de maíz (1400 y 2000 µg mL⁻¹ de Cu y Pb). A pesar de las condiciones de estrés generada por el exceso de metales, la bacteria expresa numerosas actividades promotoras del crecimiento vegetal. Bajo estas condiciones la cepa evaluada en ese trabajo, produjo entre 65.5 y 60.8 µg mL⁻¹ de ácido indol acético en presencia de concentraciones de 400 µg mL⁻¹ de cada metal, adicionalmente tuvo una producción significativa de sideróforos (31).

3.2. Especies vegetales para evaluación de potencial PGPR

Se encuentra documentado una mejora significativa en el desarrollo de algunas especies de plantas tras el uso de bacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal. Algunos de los cultivos donde se ha evaluado la respuesta frente a PGPRs son: maíz (32), algodón (33), zanahoria (34), mostaza (35) y tomate (36,37), cabe resaltar que la evaluación de dicha actividad se ha realizado en diferentes etapas del cultivo.

En ese orden de ideas, en lechuga por ejemplo, se ha observado que el largo de la planta y el ancho de la hoja es mayor cuando se realizan inoculaciones con *Azotobacter* sp.(38),

adicionalmente el uso de este microorganismo muestra que incrementa el área foliar y la capacidad de producción de clorofila (39). Cabe mencionar que la lechuga es un cultivo que se adapta muy bien a climas frescos y húmedos, y su temperatura promedio que favorece el crecimiento y buen desarrollo se encuentra entre los 15 y 20 °C (40), adicionalmente es tolerante a pH ácidos y es medianamente tolerante a la salinidad (41). De la misma manera, en plantas de algodón se observó un incremento en la longitud del brote, longitud de la raíz y peso seco de la planta cuando fueron tratadas con especies del género *Azotobacter*, además de presentar una mayor fijación de nitrógeno (30).

En el caso del tomate (*Solanum lycopersicum*), que es una de las hortalizas de mayor importancia a nivel económico mundial ya que representa el 30% de la producción hortícola y presenta amplia variedad de productos derivados (42), se ha observado que la aplicación de agroquímicos ha venido incrementado a través del tiempo, con el fin de controlar enfermedades fúngicas producidas por *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium solani* y *Alternaria solani* (43), El incremento continuo en el uso de agroquímicos en el cultivo de tomate, hace necesario que se incorporen de manera prioritaria, alternativas de fertilización que no conlleven a degradar el ecosistema y la biodiversidad.

La planta de tomate inicia su crecimiento partiendo de un tallo principal formando entre 5 y 10 hojas antes de producir el primer racimo floral, posteriormente se diferencian los dos hábitos de crecimiento, indeterminado o determinado. En plantas de crecimiento indeterminado, se forma una yema vegetativa en la axila de la hoja más joven que continúa el crecimiento y desplaza esta hoja a una posición por encima del racimo floral más reciente y sigue su crecimiento formando tres o cuatro hojas y alcanzan longitudes mayores a los 5 metros, mientras que el hábito determinado hay una fuerte brotación de yemas axilares y se producen menor número de hojas entre los racimos florales. Se caracterizan por alcanzar una longitud máxima de dos metros y desarrollar una inflorescencia por cada hoja (44).

La rusticidad de la planta de tomate permite que sea poco exigente a las condiciones del suelo. Sin embargo, es necesario que para su desarrollo tenga un buen drenaje, por ello es importante que el sustrato tenga un alto contenido de materia orgánica. Esta planta se desarrolla a 40 cm de profundidad en suelos arcillosos y arenosos (45). En cuanto al pH de suelo, el óptimo debe oscilar entre 5,8 y 6,8 para que la planta se desarrolle y disponga de nutrientes adecuadamente (45,46). Uno de los grandes beneficios del cultivo de tomate,

radica en su resistencia a los cambios de temperatura y a su corto periodo de cosecha, en donde se presentan temperaturas óptimas de crecimiento del cultivo, y temperaturas máximas y mínimas para su desarrollo a través del ciclo de vida del mismo.

Los diferentes tratamientos realizados con *Azotobacter* spp. en tomate, han demostrado la actividad promotora de crecimiento vegetal que este posee, ya que aumenta el peso seco de la planta, la longitud del tallo y de la raíz, adicionalmente *Azotobacter* spp. incrementan la actividad antioxidante del tomate, el peso fresco y la calidad del fruto (36).

3.3. Biofertilizantes

Las tecnologías de fertilización biológica son estrategias para el manejo de la nutrición y protección de los cultivos, éstas ofrecen soluciones y/o alternativas a la deficiencia de nutrientes en el suelo, permiten la sustitución total o parcial de fertilizantes sintetizados químicamente y contribuyen a la distribución de los costos de producción, aumento en la productividad, mejora en la calidad del fruto y generar un impacto positivo en el medio ambiente (47)

La utilización de microorganismos en la preparación de los distintos tipos de biofertilizantes es esencial ya que de acuerdo a la necesidad nutricional de cada tipo de suelo y cultivo se realiza el análisis y elección de una cepa y/o consorcio microbiano para tal fin. Estas preparaciones se caracterizan por contener células vivas o en fase de latencia, cada una con capacidades distintas, dentro de las cuales están: eficiencia en la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato o capacidad celulolítica empleados en la aplicación de semillas, suelo o áreas de composición con el objetivo de aumentar la población microbiana en el suelo y de esta manera acelerar los procesos y aumentar el grado de disponibilidad de nutrientes en una forma que puede ser fácilmente asimilada por la planta (48).

3.3.1. *Azotobacter* como biofertilizante

Azotobacter ha demostrado tener actividad de promotora del crecimiento vegetal de manera eficiente disminuyendo la fertilización química en los cultivos. En un estudio realizado por Romero-Perdomo en el 2017, se evaluó dicha actividad en cepas de *Azotobacter chroococcum* en cultivos de algodón en Colombia, para determinar el potencial biofertilizante de estas cepas con distintas dosis de fertilizante nitrogenado con el fin de establecer si este podría o no reducir o reemplazar las tasas de fertilización de N en cultivos

de algodón. Se pudo observar que al momento de la inoculación se aumentó significativamente el crecimiento de la planta, aumentando la longitud del brote y longitud de la raíz (34).

En 2015, Kumar evaluó la capacidad de *Azotobacter* de potenciar el crecimiento de plantas de jatropha y aumentar su afinidad de colonización por micorrizas, se observó que los cultivos que se mantuvieron en tratamiento con *Azotobacter* mostraron un mejor crecimiento y desarrollo de la planta viéndose beneficiados factores como la longitud del brote el cual aumentó hasta un 46.89%, el diámetro del brote aumentó hasta el 17.28% y el número de ramas aumentaron significativamente respecto a las control. Igualmente mostraron una mejor afinidad para ser colonizados por micorrizas arbusculares, las cuales generaron una mejor respuesta por parte de la planta frente a la absorción de nutrientes (49).

Adicionalmente, no solo se puede observar el aumento en el crecimiento de las plantas y el efecto que la inoculación con *Azotobacter* tiene sobre el desarrollo vegetal, sino que también se pueden determinar ciertas modificaciones positivas que este microorganismo puede ejercer sobre las características o propiedades de las plantas. Seyed y colaboradores en 2017 realizaron la evaluación de los cambios que se podían dar en los ácidos grasos constituyentes del relleno de granos de cártamo a causa de la biofertilización, y pudieron determinar, que el contenido de ácidos grasos saturados se reduce al interior de los granos como consecuencia de los tratamientos con fertilizantes (basados en inoculación con *Azotobacter*) realizados a las semillas, mientras que los ácidos grasos insaturados aumentan (50).

El grupo de investigación UNIDIA de la Pontificia Universidad Javeriana en 2007 realizó el aislamiento de cepas de *Azotobacter* del altiplano cundiboyacense, a las cuales se han realizado estudios en la producción de metabolitos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal. Varias de las cepas aisladas corresponden presuntamente a cuatro especies: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter paspali* y *Azotobacter beijerinckii*, a las cuales se les ha evaluado la producción de ácido indol acético, producción de sideróforos, fijación libre de nitrógeno y solubilización de fósforo. Los resultados obtenidos en estos trabajos, permitieron concluir que varias de las cepas de *Azotobacter* aisladas de suelos hortícolas del altiplano Cundiboyacense, podrían mostrar una actividad PGPR de tal forma que, aquellas que generen una mejor respuesta por parte

de la planta, podrían en un futuro ser empleadas en la formulación y producción de un biofertilizante (51,52,53).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad promotora del crecimiento vegetal de dos cepas nativas de *Azotobacter* sp. sobre la germinación de semillas y crecimiento de plantas de tomate.

4.2. Objetivos específicos

- Establecer la curva de crecimiento de dos cepas de *Azotobacter* sp. para la preparación del inóculo.
- Evaluar el efecto de las dos cepas de *Azotobacter* sp. sobre la germinación de semillas de tomate de la variedad Chonto Santa Clara.
- Evaluar el efecto de las dos cepas de *Azotobacter* sp. sobre el crecimiento de plantas de tomate, bajo condiciones de invernadero.

5. Metodología

5.1. Microorganismos

Se emplearon dos cepas de *Azotobacter* seleccionadas en trabajos previos de UNIDIA por su capacidad para producir ácido indol acético (AIA) (52), solubilizar fósforo, fijar nitrógeno de forma no simbiótica y producir sideróforos (53). Los dos aislamientos fueron obtenidos de cultivos de brócoli (C2Br) y tomate (C4T) del altiplano Cundiboyacense por Jiménez en el 2007 (51).

La cepa C4T fue identificada como *Azotobacter chroococcum* y la cepa C2Br como *Azotobacter* sp (51).

5.2. Material vegetal

Se emplearon semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad chonto Santa Clara, las cuales fueron adquiridas en la compañía *Impulse semillas*.

5.3. Reactivación de cepas de *Azotobacter*

Cada una de las cepas fue reactivada en agar y caldo nutritivo a 28°C durante 24 horas a partir del banco conservado a -80°C en caldo nutritivo con glicerol al 30%. La pureza de las cepas se verificó mediante coloración de Gram.

5.4. Preparación de inóculo

Para preparar el inóculo, inicialmente se realizó el aislamiento en medio Ashby benzoato a 28°C durante 36 horas (51) y se verificó la pureza del microorganismo mediante tinción de Gram. Se preparó una suspensión bacteriana en caldo nutritivo, ajustando una densidad óptica a 0,2 a 540 nm. Este valor de absorbancia corresponde a una concentración del inóculo de 10^8 células/ml (54).

5.5. Curva de crecimiento

Con el fin de evaluar el crecimiento de los microorganismos empleados, se realizaron muestreos de 3 ml de cada cepa a las 0h, 17h, 22h, 27h, 41h, 46h, 51h, 65h, y 70h, y se registró la densidad óptica por triplicado a 540 nm.

5.6. Inoculación de semillas

Para determinar el efecto de la aplicación de cada uno de los microorganismos sobre la germinación de semillas de tomate, se realizaron cuatro tratamientos. El primero se denominó control absoluto, en donde a las semillas se colocaron con agua destilada sin ningún elemento que afecte la germinación. El segundo y tercer tratamiento corresponden a inoculación de las semillas con las cepas C2BR y C4T respectivamente. Para tal fin, se tomó una suspensión celular de cada microorganismo a una concentración final de 10^8 células/ml, en una proporción de 1:10 con solución salina estéril (0,85% NaCl) (55) y se aplicó diariamente 1mL cada suspensión celular en el ensayo correspondiente durante 7 días. El cuarto tratamiento corresponde a la aplicación de un fertilizante comercial, siguiendo las indicaciones del productor.

5.7. Pruebas de germinación

Para evaluar germinación en condiciones de laboratorio, se dispuso de semillas en cajas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada esterilizada (cámara de germinación). Para este ensayo, se emplearon un total de 60 semillas, de las cuales, 15 se

inocularon con la cepa C2BR, 15 con la cepa C4T, 15 con un fertilizante comercial y 15 con agua destilada.

Para el montaje se colocaron 15 semillas por cada caja de Petri, las cuales se humedecieron diariamente con 1mL de cada uno de los tratamientos. Las cámaras de germinación se mantuvieron a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. El número de semillas germinadas se registró diariamente durante 8 días, teniendo como evidencia del proceso de germinación, la emergencia de la radícula. El 100% de germinación corresponde al total de semillas germinadas dispuestas para cada ensayo, siendo un ensayo único, sin réplicas.

Para las pruebas de germinación en condiciones de invernadero, se emplearon semilleros de 12 X 6 pozos, utilizando turba rubia como sustrato (Anexo 1), colocando 1 semilla por compartimento. Se sembraron un total de 42 semillas por tratamiento, agrupando en grupos de 14 semillas por réplica. El riego de los semilleros se realizó por aspersion, empleando el sistema automatizado del invernadero de docencia de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana que consiste en una aspersion durante 5 minutos cada doce horas. Diariamente durante 8 días se inoculó con 1mL de cada tratamiento al ensayo correspondiente. El número de semillas germinadas se registró diariamente, tomando en este caso como evidencia del proceso de germinación, la emergencia de la plúmula.

5.8. Trasplante de material vegetal

Una vez germinadas las semillas de cada tratamiento, a los 10 días de siembra se seleccionaron aquellas plántulas que se encontraban en condiciones adecuadas para trasplante a macetas plásticas de 14 cm de diámetro, altura de 12 cm y un volumen máximo de 1,6 L. Se colocó una plántula por maceta y se adicionaron 3 ml de cada tratamiento a la rizósfera. El sustrato empleado consistió en una mezcla de suelo (franco-limoso), turba rubia y cascarilla de arroz, en una proporción de 4:2:1 respectivamente (56).

5.9 Evaluación del crecimiento

Los parámetros de crecimiento se evaluaron semanalmente, durante 10 semanas, empleando el método destructivo. Para esto, tres plantas de cada tratamiento fueron extraídas. Los parámetros de crecimiento evaluados fueron: número de hojas, longitud de la raíz en centímetros, longitud total de la planta en centímetros, peso seco total de la planta, peso seco de la parte aérea de la planta y peso seco de la raíz en gramos.

5.10. Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias de la actividad promotora de crecimiento vegetal en los tratamientos empleados, se mantuvieron las tres réplicas por cada tratamiento y se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, en donde el valor de confianza se ajustó al 95%.

6. Resultados

6.1. Cinética de crecimiento de las cepas de *Azotobacter* C4T y C2Br

El crecimiento de las cepas C4T y C2Br se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm, tomando muestras a las 0, 17, 22, 27, 41, 46, 51, 65, y 70 horas, con el fin de establecer la cinética de crecimiento para determinar el tiempo en el cual cada cepa alcanza el final de la fase exponencial y así llevar a cabo los ensayos posteriores de inoculación de semillas y plántulas. La figura 1 muestra una curva de crecimiento similar para las dos cepas, alcanzando la fase estacionaria hacia las 40 horas.

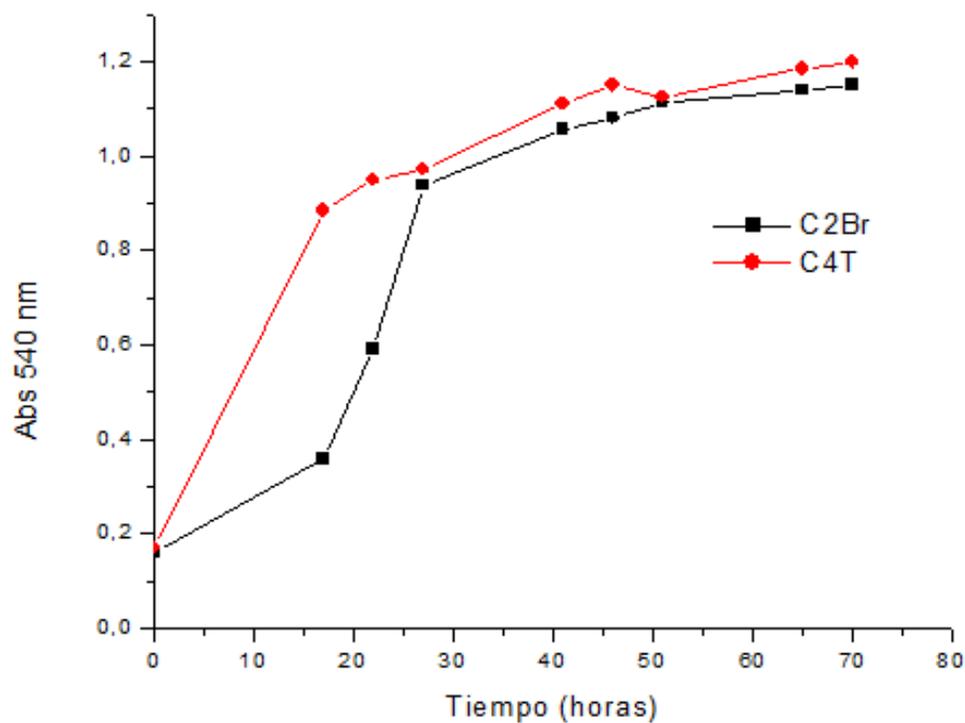


Figura 1. Curva de crecimiento de las cepas C4T y C2Br mediante espectrofotometría a 540 nm

La regresión calculada para la fase exponencial en las dos cepas (C4T y C2Br) (Figura 2) se realizó con el fin de determinar la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación. Los resultados muestran, que tanto la cepa C4T como la cepa C2Br cumplen con la cinética de orden 1, con una velocidad específica de crecimiento de $0,0089 \text{ h}^{-1}$ y $0,0636 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 77,88 horas y 10,89 horas respectivamente, teniendo en cuenta estos resultados para la preparación del inóculo de las cepas a evaluar determinando 50 horas de cultivo para el inóculo.

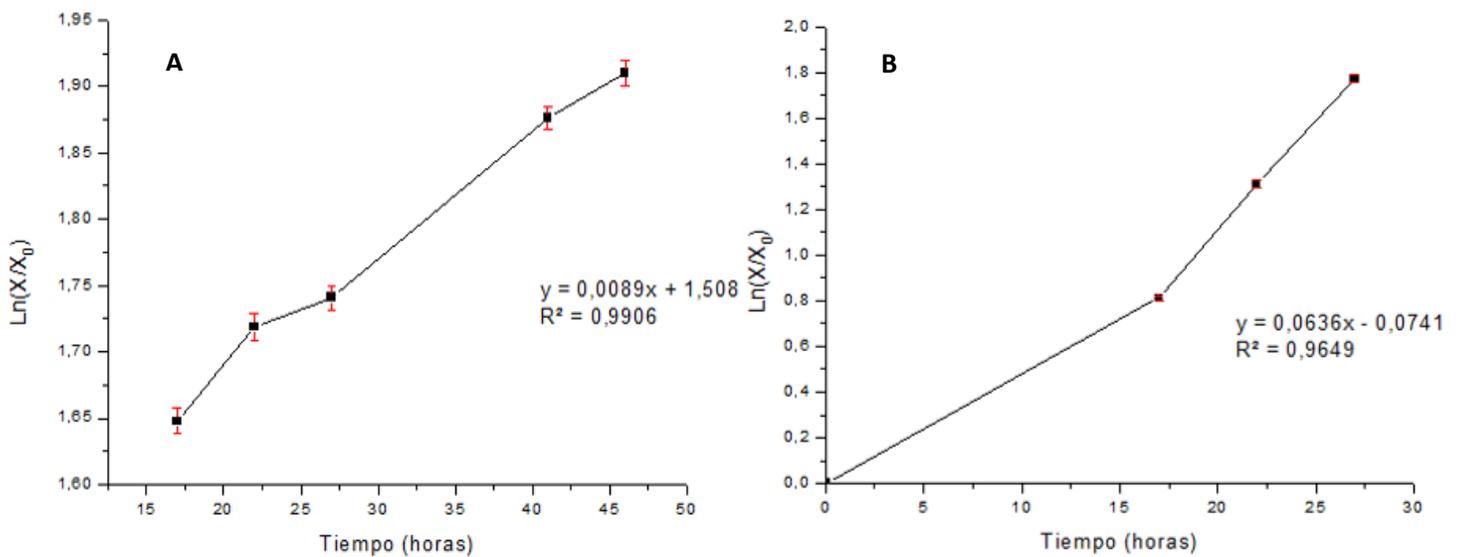


Figura 2. A) Cinética de orden 1 de la cepa C4T en su fase logarítmica. **B)** Cinética de orden 1 de la cepa C2Br en su fase logarítmica

6.2 Porcentaje de germinación *in vivo* e *in vitro* de semillas de tomate

La evaluación de la germinación *in vitro* (figura 5) mostró que el porcentaje de germinación en los tratamientos con las cepas C4T y C2Br fue superior al control, después de 10 días en cámara húmeda, el 80 %, de las semillas inoculadas con las cepas de *Azotobacter* germinaron, mientras que solo el 46% lo hicieron en el caso del tratamiento con el fertilizante

comercial. Por su parte el 66% de las semillas del tratamiento control habían germinado después de 10 días en la cámara húmeda (figura 5).

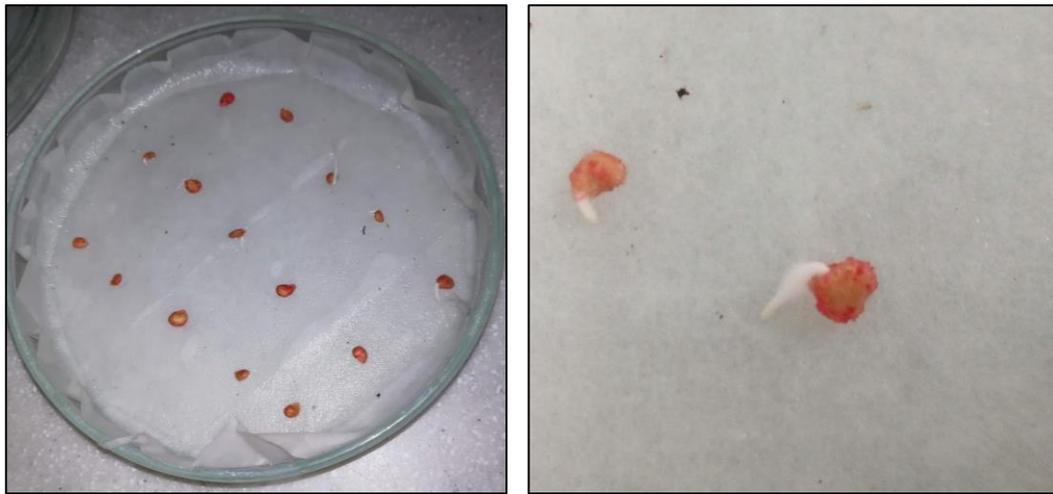


Figura 3. Germinación de semillas de tomate en condiciones in vitro.

Con el fin de determinar el porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos bajo condiciones de invernadero, se realizó la siembra por triplicado de catorce semillas por tratamiento (figura 3). Este experimento se llevó a cabo a una temperatura promedio de 27°C y una humedad relativa promedio de 35%. En la figura 3, se observa la disposición de los semilleros empleados para las pruebas de germinación, utilizando una distribución que facilitó un riego homogéneo y monitoreo de cada una de las semillas.

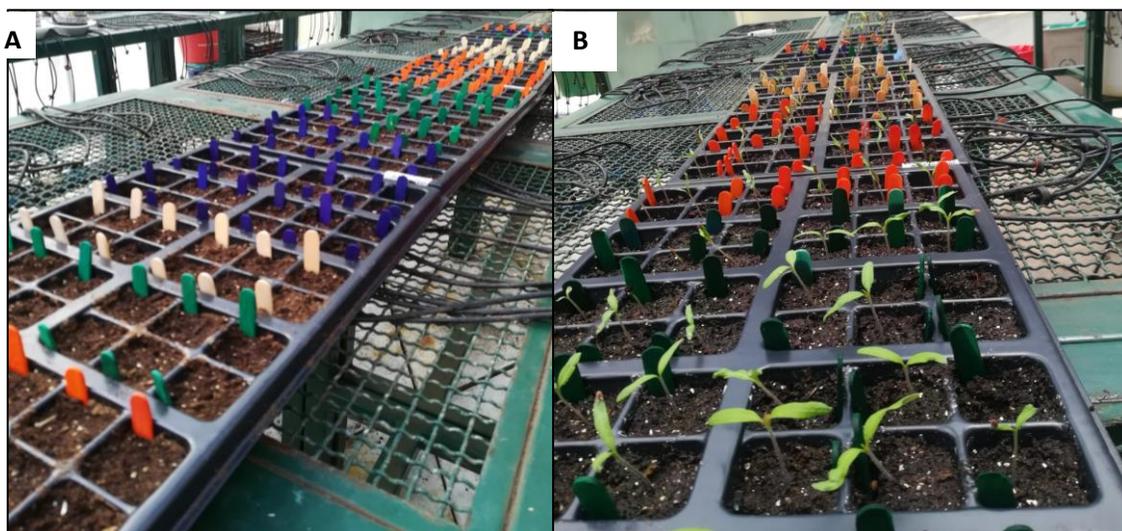


Figura 3. Siembra en semilleros bajo condiciones de invernadero. **A.** Día 0 de siembra y **B.** 10 días después de la siembra

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de germinación entre réplicas no presentaron diferencia significativa (Anexo 2), por lo que es válido promediar los valores obtenidos en cada tratamiento. Como se observa en la figura 5, el mayor porcentaje de germinación se presentó con las semillas inoculadas con la cepa de *Azotobacter* C4T 82,22%, mientras que con la cepa C2Br, se obtuvo un porcentaje de 68,89 %. Para el caso de las semillas tratadas con el fertilizante comercial y las semillas control, los porcentajes obtenidos fueron inferiores, con valores promedio de 62,2 % en los dos casos. A pesar de esto, el análisis estadístico arrojó un valor de significancia mayor a 0,05 lo que indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 3).

De forma paralela se realizó el registro de la temperatura máxima, mínima y humedad relativa a lo largo del estudio bajo condiciones de invernadero. La figura 6 muestra ligeras variaciones en la temperatura máxima y mínima, siendo 38°C la temperatura máxima registrada y 9 °C, la mínima. El cambio de temperatura entre el día y la noche correspondió a 29 °C, sin embargo, las variaciones de la temperatura máxima y mínima, permitió evaluar los parámetros de crecimiento vegetal sin problema.

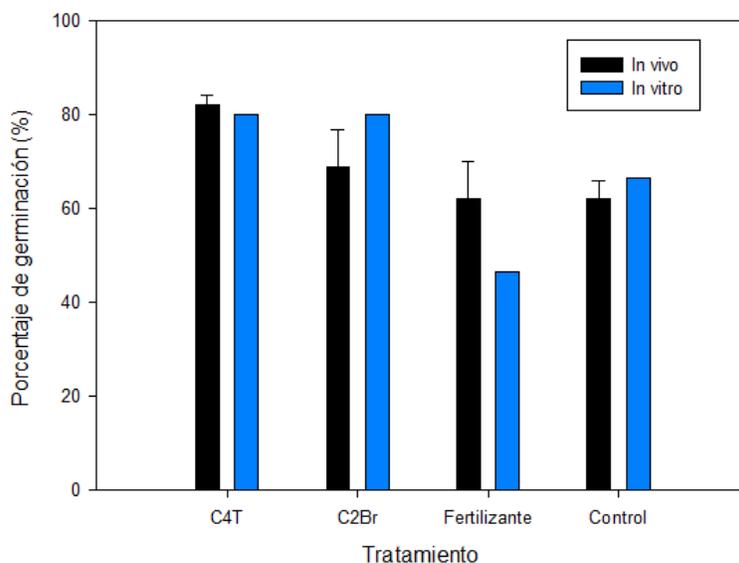


Figura 4. Porcentaje de germinación de semillas de tomate en condiciones in vivo (19 días) e in vitro (10 días)

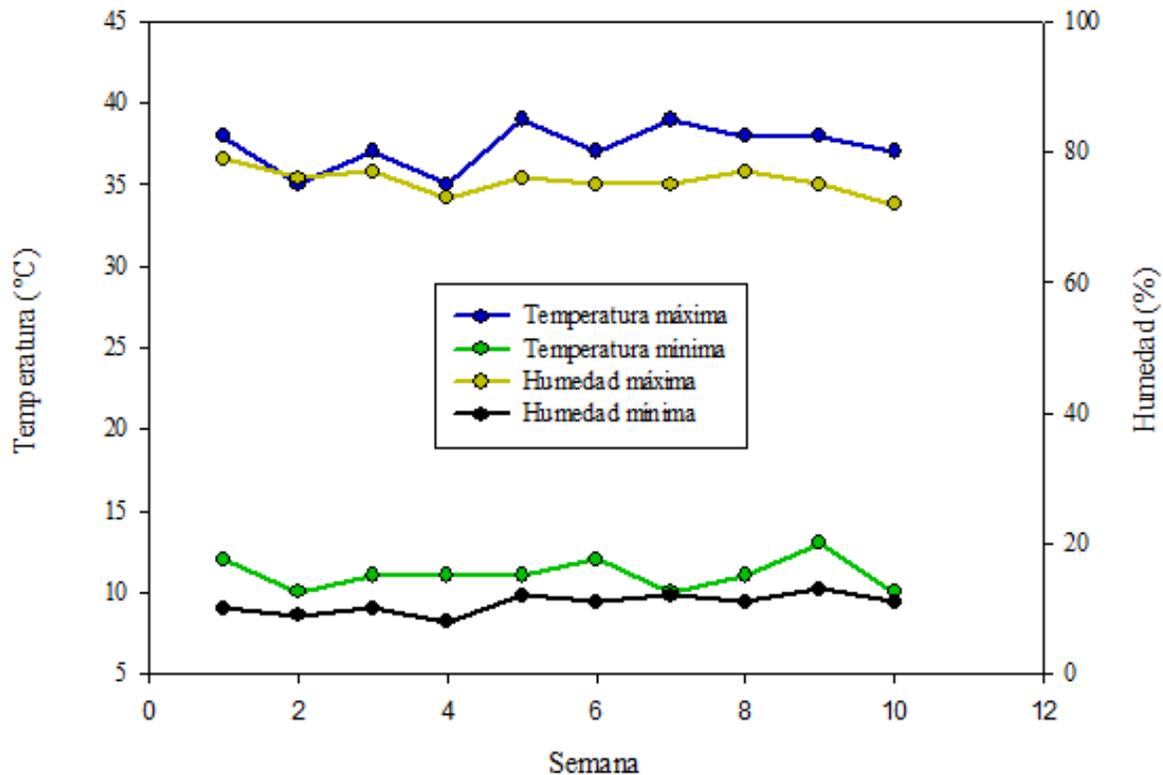


Figura 5. Registro de la temperatura máxima, mínima y humedad relativa en el invernadero, durante el periodo de experimentación.

6.3-Pruebas en invernadero

Como se mencionó en materiales y métodos, la evaluación del crecimiento se realizó considerando los parámetros de longitud total de la planta, longitud de la parte aérea, longitud de la raíz, peso fresco total y número de hojas. En cuanto al número de hojas, se observó que las plantas inoculadas con las cepas C4T y C2Br presentaron un mayor número de hojas después de 10 semanas, en comparación con las plantas control. Las plantas inoculadas con las cepas C4T y C2Br, presentaron el mayor número de hojas durante las primeras dos semanas (Tabla 1), sin embargo, a partir de la semana 5 las plantas tratadas con fertilizante aumentaron su número de hojas, y desde la semana 7 hasta la semana 10 los resultados no variaron (figura 9A). Cabe resaltar que, aunque las hojas de las plantas con fertilizante comercial tenían mayor tamaño, presentaron clorosis

generalizada y pérdida de turgencia a diferencia de las plantas inoculadas con C4T y C2Br, donde era evidente la presencia de clorofila en las hojas y mayor vigor de las plantas (figura 7).

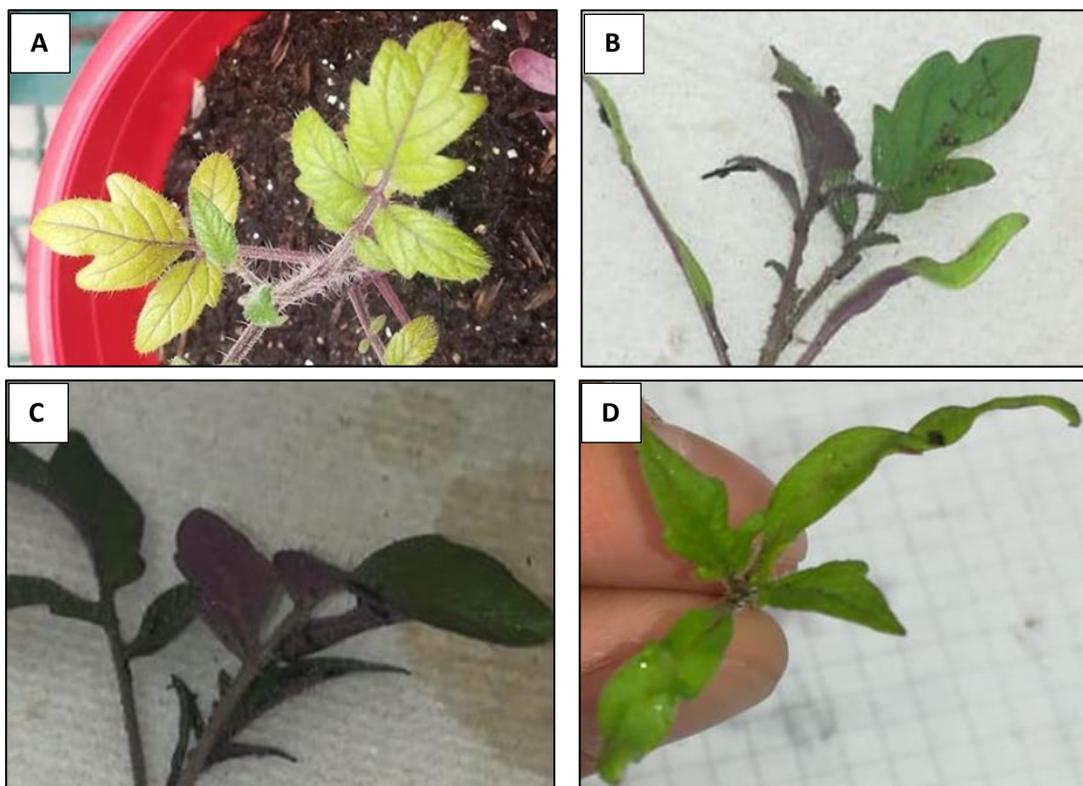


Figura 6. Apariencia de las hojas a las 8 semanas de evaluación. **A)** Tratamiento con fertilizante **B)** Inoculación con la cepa C2Br **C)** inoculación con la cepa C4T **D)** Control

Tabla 1. Número de hojas de plantas de tomate en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.

Semana	Número de hojas			
	Control	C2Br	C4T	Fertilizante
1	3 ± 1,2	6 ± 1,5	4	4
2	4	5 ± 1,2	8 ± 1,0	5 ± 2,5
3	4	5	5 ± 1,2	7 ± 0,6
4	3 ± 1,2	5 ± 0,6	6 ± 0,6	6 ± 1,5
5	3 ± 1,2	7 ± 1,6	6 ± 1,5	8 ± 3,6
6	3 ± 1,2	5 ± 0,6	7 ± 0,6	7 ± 2,3
7	3 ± 0,6	6 ± 1,5	7 ± 1,0	6 ± 1,7
8	3 ± 0,6	7 ± 3,2	7 ± 2,5	9 ± 3,1
9	4 ± 1,0	6 ± 1,0	6 ± 1,5	9 ± 3,2
10	3 ± 1,2	7 ± 1,5	6 ± 0,5	10 ± 1,2

Al final del período de evaluación (semana 10), los tratamientos con las cepas C4T, C2Br y fertilizante comercial, presentaron valores similares para este parámetro (3,6 , 3,9 y 4 cm respectivamente) (Tabla 2), indicando que no se presentan diferencias significativas.

Tabla 2. Longitud de la raíz de plantas de tomate en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.

Longitud de la raíz (cm)				
Semana	Control	C2Br	C4T	Fertilizante
1	2,4 ± 0,5	4,2 ± 0,8	4,3 ± 2,4	2,2 ± 0,3
2	3,8 ± 0,8	4,2 ± 1,1	5,2 ± 0,5	3,8 ± 0,6
3	3,8 ± 0,4	4,8 ± 0,4	4,5	6,3 ± 0,6
4	3,6 ± 0,4	3,8 ± 0,3	4,3	5,8 ± 1,8
5	1,5 ± 0,9	4,0 ± 0,7	6,9	6,7 ± 3,5
6	1,5 ± 0,6	4,2 ± 0,6	5,1	4,4 ± 0,8
7	1,5 ± 0,9	2,3 ± 0,6	3,3 ± 1,0	3,3 ± 0,3
8	1,5 ± 0,5	3,0 ± 1,0	4,2 ± 0,9	3,7 ± 1,2
9	1,2 ± 0,3	2,6 ± 0,2	3,6 ± 0,3	3,5 ± 0,5
10	2,2 ± 0,8	3,9 ± 1,1	3,6 ± 1,8	4,0 ± 0,5

En cuanto a la longitud del tallo, en la figura 9C se observan diferencias significativas (<0,05) en todos los tratamientos, durante las 10 semanas de evaluación. Las plantas con fertilizante presentaron la mayor longitud del tallo, seguido de las plantas inoculadas con las cepas de *Azotobacter* y por último el control (Tabla 3). A pesar de la mayor longitud del tallo de las plantas tratadas con el fertilizante, se observó, que este era delgado y en algunos casos las plantas mostraron un ligero volcamiento. En contraste, el tallo de las plantas inoculadas con las cepas de *Azotobacter*, presentó mayor grosor y vigor (Figura 8).



Figura 7. Apariencia de las plantas de tomate Después de 8 semanas. Obsérvese la elongación del tallo en los diferentes tratamientos **A) Fertilizante B) C2Br C) C4T D) Control**

Tabla 3. Longitud del tallo de plantas de tomate en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.

Longitud del tallo (cm)				
Semana	Control	C2Br	C4T	Fertilizante
1	3,5 ± 1,0	3,9 ± 0,2	3,0 ± 0,5	5,6 ± 0,6
2	3,7 ± 0,3	3,9 ± 0,6	4,6 ± 0,6	4,3 ± 1,3
3	3,9 ± 1,0	4,4 ± 0,7	5,7 ± 0,6	6,9 ± 0,8
4	3,5 ± 0,5	5,0 ± 1,0	4,8 ± 0,3	7,2 ± 1,0
5	3,2 ± 0,3	6,3 ± 0,4	5,2 ± 0,8	7,3 ± 2,8
6	3,6 ± 0,2	6,4 ± 1,0	4,8 ± 1,1	8,4 ± 2,6
7	4,2 ± 0,3	5,7 ± 0,6	6,2 ± 0,6	9,2 ± 3,0
8	3,5 ± 0,5	6,8 ± 0,8	5,5 ± 0,9	7,7 ± 0,6
9	3,3 ± 0,3	6,3 ± 0,6	5,9 ± 0,7	8,0 ± 2,6
10	3,5 ± 0,5	5,5 ± 1,5	5,0 ± 0,6	9,0 ± 1,7

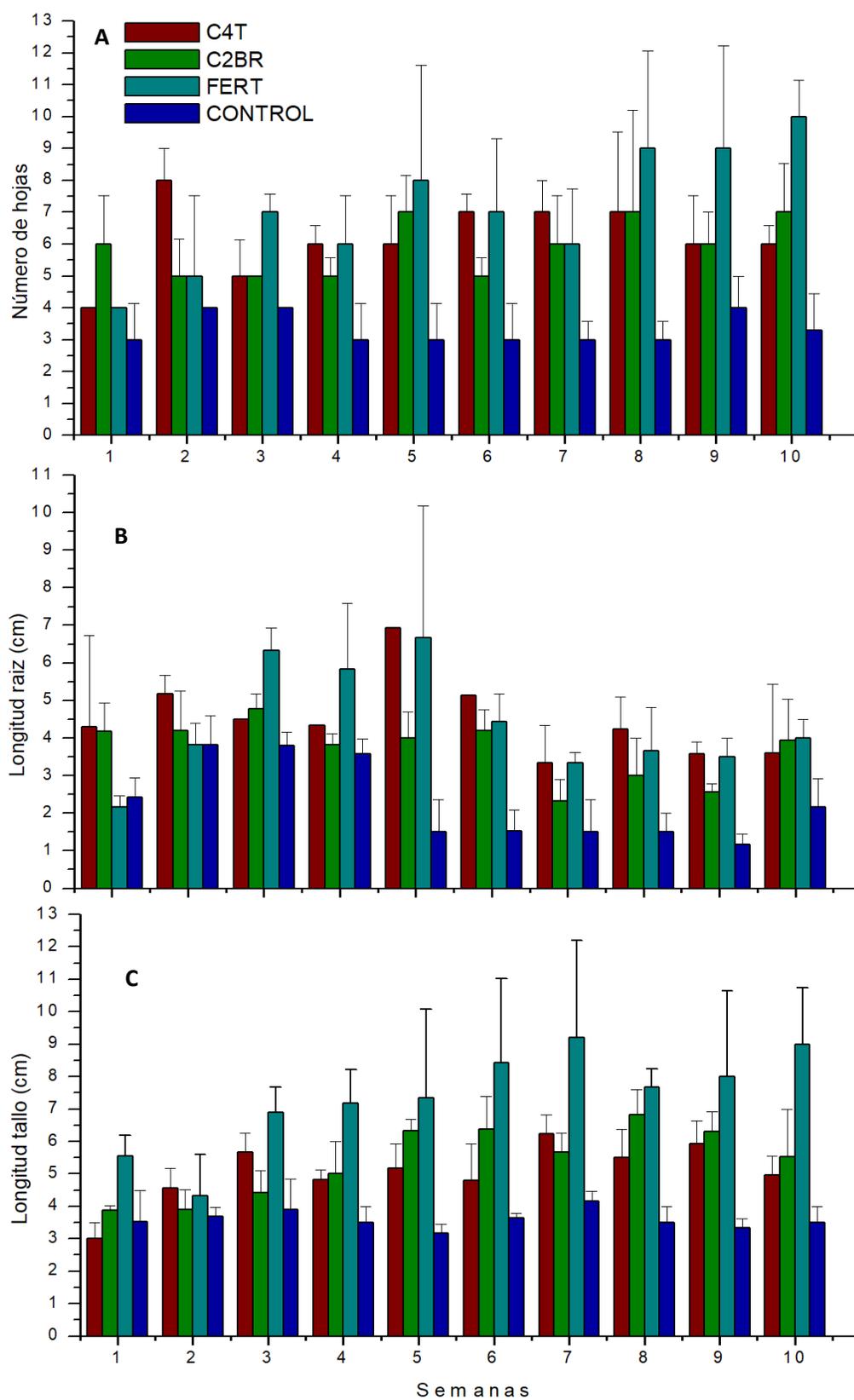


Figura 8. Parámetros fisiológicos de crecimiento vegetal. **A)** Número de hojas **B)** Longitud de la raíz **C)** Longitud del tallo

En cuanto al peso fresco de las plantas en los tres tratamientos, se presentaron diferencias significativas (Anexo 7) con respecto al control. Se observó que las plantas en el tratamiento con fertilizante presentaron el mayor peso fresco durante todo el estudio. En cuanto a las plantas inoculadas con las cepas C4T y C2Br, se observó que durante las primeras 5 semanas, las plantas del tratamiento con la cepa C4T tuvieron un mayor peso húmedo promedio que las inoculadas con la cepa C2Br. Sin embargo, a partir de la semana 6 se invierte esta tendencia y en la semana 7, se observó que las plantas del tratamiento con C4T no incrementaron su peso fresco, contrario a lo que ocurrió con las plantas del tratamiento con C2Br (Tabla 4). Finalmente, en la semana 10 de evaluación se observó que las plantas del tratamiento con fertilizante presentaron un peso promedio 20 veces mayor que las plantas control, mientras que para las plantas de los tratamientos con las cepas de *Azotobacter*, el peso fresco promedio fue 10 veces superior (Tabla 4) (Figura 9A).

Tabla 4. Biomasa vegetal representada en peso fresco en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.

Peso fresco vegetal (g)				
Semana	Control	C2Br	C4T	Fertilizante
1	0,070 ± 0,026	0,137 ± 0,025	0,087 ± 0,015	0,417 ± 0,129
2	0,123 ± 0,023	0,163 ± 0,071	0,253 ± 0,055	0,280 ± 0,299
3	0,097 ± 0,035	0,207 ± 0,015	0,450 ± 0,095	0,837 ± 0,067
4	0,070 ± 0,030	0,317 ± 0,099	0,380 ± 0,111	0,907 ± 0,430
5	0,077 ± 0,012	0,590 ± 0,157	0,443 ± 0,042	1,137 ± 0,856
6	0,090 ± 0,036	0,603 ± 0,104	0,483 ± 0,183	0,687 ± 0,320
7	0,113 ± 0,025	0,573 ± 0,165	0,463 ± 0,044	1,433 ± 0,351
8	0,063 ± 0,015	0,747 ± 0,107	0,463 ± 0,153	1,157 ± 0,137
9	0,063 ± 0,06	0,757 ± 0,065	0,483 ± 0,057	1,200 ± 0,142
10	0,067 ± 0,015	0,780 ± 0,046	0,503 ± 0,047	1,143 ± 0,091

En cuanto al peso seco total, de la parte aérea y de la raíz, se observó un aumento progresivo durante el tiempo de evaluación (figura 10B, 10C, 10D), siendo las plantas con fertilizante las que registraron los mayores valores promedio, aun cuando también presentaron la mayor desviación estándar, como consecuencia de la poca homogeneidad en el crecimiento (Tabla 5). Por otro lado, las plantas inoculadas con las cepas C4T y C2Br mostraron un aumento progresivo de la biomasa durante todo el experimento, las plantas

mantuvieron una uniformidad en su desarrollo y los valores de desviación estándar en estos casos no fueron mayores a 0,165. Para los tres tratamientos, los valores de peso seco total, de raíz y aéreo, fueron significativamente mayores con respecto al control (Tabla 6 y 7). Finalmente, de todos los parámetros evaluados en el estudio, el peso seco de la parte aérea fue el que mostró un mayor aumento durante todo el experimento, especialmente en los tratamientos con las cepas de *Azotobacter* (figura 10C).

Tabla 5. Biomasa vegetal representada en peso seco en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.

Peso seco vegetal (g)				
Semana	Control	C2Br	C4T	Fertilizante
1	0,006 ± 0,002	0,009 ± 0,025	0,008 ± 0,000	0,039 ± 0,015
2	0,009 ± 0,001	0,012 ± 0,071	0,023 ± 0,002	0,025 ± 0,029
3	0,009 ± 0,002	0,020 ± 0,015	0,041 ± 0,006	0,081 ± 0,011
4	0,007 ± 0,003	0,032 ± 0,099	0,044 ± 0,013	0,104 ± 0,042
5	0,007 ± 0,001	0,062 ± 0,157	0,060 ± 0,005	0,131 ± 0,105
6	0,010 ± 0,005	0,078 ± 0,104	0,070 ± 0,026	0,098 ± 0,047
7	0,009 ± 0,002	0,054 ± 0,165	0,073 ± 0,007	0,173 ± 0,057
8	0,006 ± 0,002	0,071 ± 0,015	0,052 ± 0,022	0,117 ± 0,014
9	0,013 ± 0,003	0,064 ± 0,025	0,065 ± 0,013	0,113 ± 0,062
10	0,009 ± 0,002	0,065 ± 0,020	0,061 ± 0,006	0,139 ± 0,060

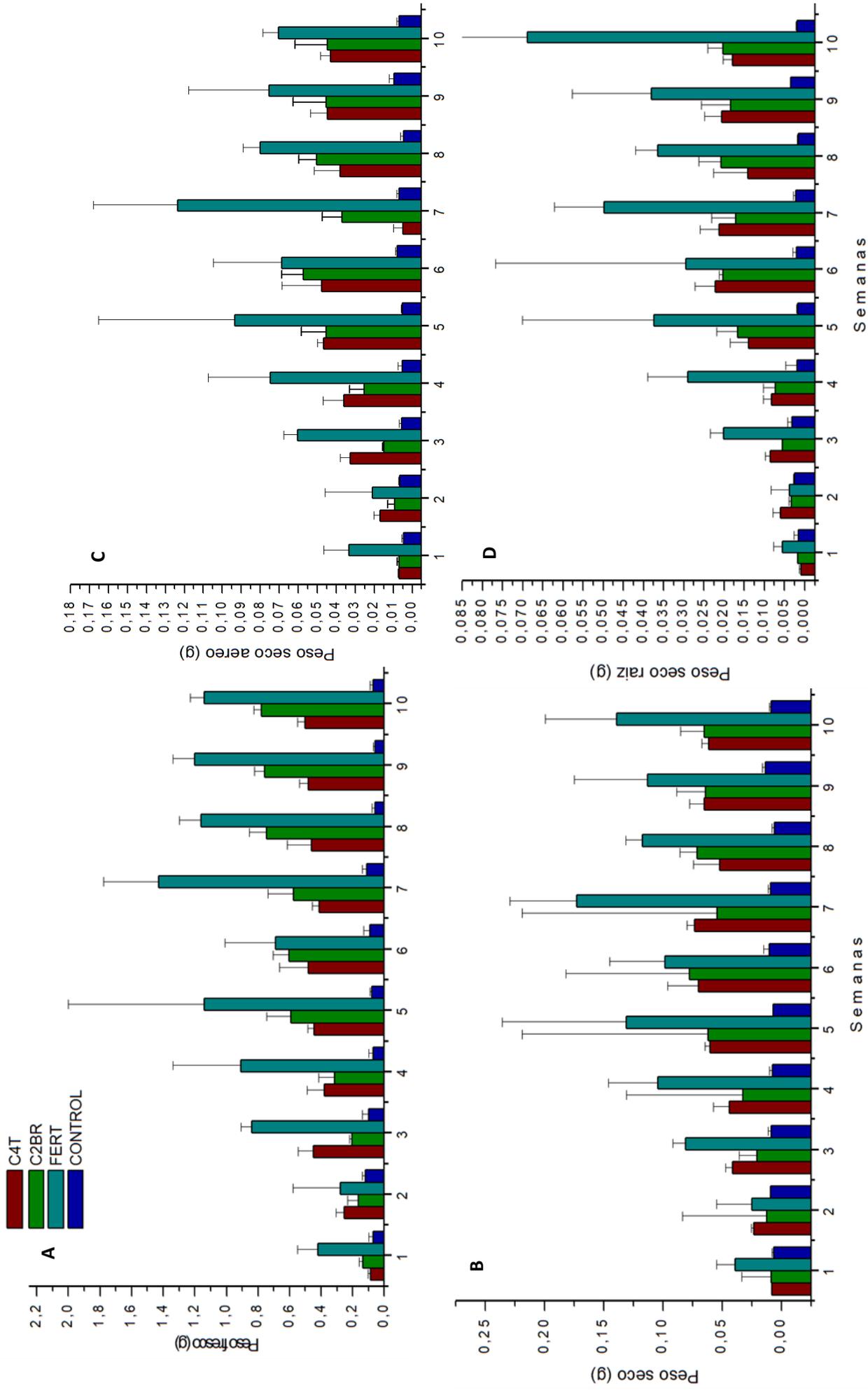


Figura 9. Parámetros fisiológicos de crecimiento vegetal. A) Peso fresco B) Peso seco total C) Peso seco aéreo D) Peso seco raíz

Tabla 6. Biomasa vegetal representada en peso seco de la raíz en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.

Semana	Peso seco raíz (g)			
	Control	C2Br	C4T	Fertilizante
1	0,0015 ± 0,0011	0,0017 ± 0,0002	0,001 ± 0,0004	0,0055 ± 0,0022
2	0,0025 ± 0,0003	0,0032 ± 0,0007	0,0060 ± 0,002	0,0037 ± 0,0046
3	0,0031 ± 0,0003	0,0055 ± 0,0002	0,0085 ± 0,001	0,0201 ± 0,0034
4	0,0019 ± 0,0028	0,0072 ± 0,0031	0,0082 ± 0,002	0,0290 ± 0,0099
5	0,0017 ± 0,0003	0,0166 ± 0,0053	0,0139 ± 0,005	0,0374 ± 0,0327
6	0,0021 ± 0,0009	0,02030 ± 0,001	0,0221 ± 0,005	0,0295 ± 0,0472
7	0,0022 ± 0,0007	0,0170 ± 0,0061	0,0212 ± 0,005	0,0498 ± 0,0123
8	0,0016 ± 0,0003	0,0207 ± 0,0057	0,0141 ± 0,008	0,0364 ± 0,0056
9	0,0035 ± 0,0001	0,0183 ± 0,0073	0,0206 ± 0,004	0,0380 ± 0,0197
10	0,0019 ± 0,0003	0,0202 ± 0,0073	0,0179 ± 0,002	0,0688 ± 0,0197

Tabla 7. Biomasa vegetal representada en peso seco aéreo en cada tratamiento durante las 10 semanas de evaluación.

Semana	Peso seco aéreo (g)			
	Control	C2Br	C4T	Fertilizante
1	0,0046 ± 0,0008	0,007 ± 0,0009	0,007 ± 0,0006	0,0334 ± 0,0132
2	0,0064 ± 0,0007	0,0091 ± 0,0036	0,017 ± 0,0031	0,0210 ± 0,0248
3	0,0055 ± 0,0013	0,0148 ± 0,0008	0,0327 ± 0,005	0,0604 ± 0,0073
4	0,0052 ± 0,0024	0,0251 ± 0,008	0,0360 ± 0,011	0,0747 ± 0,0361
5	0,0052 ± 0,0006	0,0453 ± 0,013	0,0465 ± 0,003	0,0933 ± 0,0722
6	0,0079 ± 0,0009	0,0574 ± 0,011	0,0477 ± 0,021	0,0688 ± 0,0361
7	0,0067 ± 0,0014	0,0370 ± 0,010	0,0514 ± 0,005	0,1236 ± 0,0443
8	0,0044 ± 0,0019	0,0503 ± 0,009	0,0379 ± 0,014	0,0801 ± 0,0088
9	0,0096 ± 0,0027	0,0454 ± 0,017	0,0447 ± 0,009	0,0754 ± 0,0425
10	0,0068 ± 0,0013	0,0447 ± 0,017	0,0429 ± 0,005	0,0705 ± 0,0082

7. Discusión

El uso de *Azotobacter* sp. como biofertilizante se basa en su potencial para promover el crecimiento vegetal PGPR. La habilidad de la gran mayoría de las bacterias pertenecientes a este género se basa en la producción de reguladores de crecimiento como ácido indol acético, producción de sideróforos, fijación libre de nitrógeno y solubilización de fósforo. *Azotobacter* sp. también presenta un amplio rango de actividad antagónica frente a fitopatógenos (57). Dentro del trabajo realizado por la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) en el aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* sp. de cultivos hortícolas del altiplano cundiboyacense (51), se encuentra documentado que las cepas empleadas en este estudio (C4T y C2Br) son diazótrofes, producen ácido indol acético (52), sideróforos (53) y tienen la capacidad de solubilizar

fósforo (58), lo cual hizo que fueran promisorias para la evaluación *in vivo* de su potencial PGPR.

7.1. Evaluación de cinéticas de crecimiento de cepas de *Azotobacter* sp (C4T y C2Br)

La cinética de crecimiento para cada una de las cepas de *Azotobacter* sp, se realizó para establecer el tiempo al cual se debía preparar el inóculo con el que se daría inicio a la fase de evaluación de los parámetros de crecimiento de las plantas de tomate. Esto con el fin de determinar *in vivo* la capacidad de las cepas evaluadas para promover el crecimiento vegetal.

La curva de crecimiento (Figura 1) muestra que las cepas C4T y C2BR, alcanzan su fase exponencial a las 41 horas de cultivo y dan inicio a la fase estacionaria. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Quintero en 2016 en un trabajo realizado con las mismas cepas, se observa que hay una variación en los tiempos de crecimiento de los microorganismos, toda vez que, en ese trabajo, el mayor punto de la fase exponencial se presentó a las 72 horas.

Existen varios factores que pudieron afectar la cinética de crecimiento, entre los que se puede considerar, la producción de exopolisacáridos durante el proceso de incubación del microorganismo que pudieron afectar la lectura espectrofotométrica, ya que se reporta que *Azotobacter* sp. posee la capacidad de producir estos metabolitos asociados al crecimiento (59). Otra razón que puede explicar esta diferencia es la composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de las cepas en cada caso. En el trabajo de Quintero, se utilizó medio Ashby-benzoato que es un medio de cultivo libre de nitrógeno para el crecimiento de *Azotobacter* sp. que, por tratarse de un medio selectivo, disminuye la velocidad de crecimiento. En este trabajo por su parte, se empleó medio nutritivo que contiene fuentes nutricionales fácilmente asimilables y favorece el tiempo de duplicación del microorganismo. Es importante aclarar que en los dos estudios se mantuvieron las mismas condiciones de agitación y temperatura.

En un estudio realizado por Owlia y colaboradores en el 2012 (60), se determinó que la tasa de crecimiento de cepas de *Azotobacter* sp. presentaron una fase exponencial entre las 12 y las 96 horas de cultivo. Sin embargo, en este estudio, los microorganismos fueron

crecidos en medio Ashby-manitol, que es específico para *Azotobacter* sp. Esto indica que el crecimiento en un medio selectivo se puede dar en mayor tiempo, mientras que, empleando medios nutritivos, el tiempo de adaptación se reduce y la tasa de duplicación celular aumenta.

De otra parte, en este trabajo se utilizó el método espectrofotométrico para determinar la biomasa celular a diferencia del método por peso seco celular utilizado por Quintero (52). Aunque la determinación del peso seco es un método directo poco sensible, tiene la ventaja de proporcionar unidades de masa útiles en ecuaciones para la construcción de modelos matemáticos. Los métodos espectrofotométricos por su parte son más sensibles y pueden detectar bajas densidades bacterianas. Sin embargo, se puede ver afectado por metabolitos o sustancias ajenas a la biomasa, sobre estimando el resultado obtenido (61).

7.2 Evaluación del porcentaje de germinación

La determinación del porcentaje de germinación se llevó a cabo con el fin de evaluar el efecto de *Azotobacter* sp. sobre la germinación de semillas de tomate *in vivo* e *in vitro*, empleando cuatro tratamientos que corresponden a inoculación de semillas con las cepas C4T y C2Br respectivamente, un fertilizante comercial y un control absoluto (figura 5).

El uso de biofertilizantes ha sido ampliamente reportado a nivel mundial por su capacidad para promover la germinación de semillas y el crecimiento vegetal. Como se observa en la Figura 5. el tratamiento correspondiente a la inoculación con *Azotobacter* sp. C4T presentó el mayor porcentaje de germinación (82,22%) bajo condiciones de invernadero, seguido por C2Br (68,89%). Las semillas tratadas con el fertilizante comercial presentaron un porcentaje de germinación igual al obtenido para las semillas del control (62,22%). Estos resultados son similares a los obtenidos por Mahato en 2009 (62) quien empleó un biofertilizante con *Azotobacter* sp. en semillas de tomate y obtuvo, al quinto día, un porcentaje de germinación del 90%.

En otro trabajo se demostró el efecto positivo de *Azotobacter* sp. sobre la germinación de semillas de tomate frente al tratamiento control y al género *Azospirillum* sp., en dicho estudio, se obtuvieron valores del 70% y 63% de germinación, respectivamente (63). Trabajo similar realizado por Ibiene *et al.* (64) demostró que las semillas de tomate inoculadas con *Azotobacter* sp. presentaron mayor porcentaje de germinación, mejor crecimiento, favorable respuesta a factores de estrés prolongados y resistencia a un amplio

rango de enfermedades. Otros estudios realizados en guayaba por Pathak y colaboradores en 2013 (65) también han demostrado la necesidad de emplear cepas con capacidad PGPR; estos autores además de emplear *Pseudomonas maltophilia* y *Azotobacter chroococcum*, han incorporado el uso de estiércol en conjunto con materia orgánica, observando con esto un mayor porcentaje de germinación.

Una de las razones que explica el mayor porcentaje de germinación *in vivo* e *in vitro* en las semillas inoculadas con cepa C4T, se debe a su capacidad para producir AIA, que corresponde a una auxina relacionada con el crecimiento radicular, elongación de tallo, aumento de la biomasa e incremento en el área foliar (66). Los resultados obtenidos por Quintero en 2016 con las cepas C4T y C2Br muestran una producción de AIA de 356,18 y 23,4 ppm respectivamente (52), soportando la hipótesis de que este metabolito secundario es el responsable de los porcentajes de germinación obtenidos en este trabajo.

Se ha documentado que la producción de AIA por parte de los microorganismos es el principal activador de la emergencia de la radícula en semillas de maíz y elongación de plántulas de ballica. Así mismo, se reporta que a mayor producción de AIA por parte de *Azotobacter* sp. mayor será el porcentaje de germinación y elongación de plántulas (67)(66).

A pesar de los beneficios anteriormente descritos, la aplicación de fertilizantes inorgánicos sigue siendo la alternativa más empleada por los agricultores debido al aumento del rendimiento y productividad de los cultivos a corto plazo, a causa de que al ser químicamente sintetizados proveen las dosis recomendadas de nutrientes para cada uno de los cultivos a tratar (63). Sin embargo, la aplicación de estos compuestos no ha sido útil en la agricultura intensiva a largo plazo, ya que a menudo se asocia con acidez del suelo, el desequilibrio de nutrientes y la contaminación de fuentes hídricas (68).

7.3 Evaluación de parámetros fisiológicos de crecimiento

La habilidad PGPR de algunos microorganismos es evidenciada en términos de crecimiento y desarrollo vegetal. Se ha demostrado que la planta se ve beneficiada por la producción de reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), fijación no simbiótica de nitrógeno y solubilización del fósforo entre otras, permitiendo así un aumento en la longitud del tallo, longitud radicular, número de hojas, peso fresco y seco. Basado en los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* realizados por UNIDIA para la caracterización metabólica

de estas cepas, se propuso en este estudio evaluar *in vivo* el efecto de las dos cepas de *Azotobacter* sp. sobre el crecimiento de plantas de tomate bajo condiciones de invernadero.

7.3.1. Número de hojas

El área foliar que se encuentra representada en el número de hojas por planta está directamente relacionada con la disponibilidad de nitrógeno, producto de los procesos de mineralización en el suelo (69).

La fijación libre del nitrógeno es otro factor importante en el aumento del área foliar en las plantas, ya que está dada por la interacción entre la raíz de la planta y los microorganismos diazótrofos, como *Azotobacter* sp asociados a la estimulación vegetal, bien sea fitoestimulación o biofertilización (70). De igual forma, la secreción de exudados radiculares por parte de la planta está relacionado con el desarrollo de las comunidades microbianas que generan un beneficio para esta. Algunos de los microorganismos benéficos diazótrofos que hacen parte de comunidades microbianas de la rizósfera en cultivos hortícolas y que han sido ampliamente estudiados son: *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus*, entre otros (71).

En este estudio se evidenció una diferencia significativa (Anexo 4) en el número de hojas en cada tratamiento, frente al tratamiento control. Se observó que, al cabo de 10 semanas, el tratamiento con mayor número de hojas fue Fertilizante, seguido de la inoculación con la cepa C2Br, C4T, y por último el control, con valores de 10, 7, 6 y 3 hojas respectivamente. Estos resultados debidos a que *Azotobacter* sp. es capaz de fijar de forma libre nitrógeno atmosférico, de tal modo que se encuentre disponible para la planta aumentando así el número de hojas durante su crecimiento (72).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado por diferentes autores, quienes observaron que la inoculación con especies del género *Azotobacter* sp. incluido *Azotobacter chroococcum*, además de estimular el aumento del área foliar brindan un mayor contenido de clorofila y proteínas a las hojas. De otra parte, se encuentra documentado que la concentración de nitrógeno en la hoja de las plantas tiene una relación directa con el tamaño, así como con la disposición y la cantidad de clorofila de estas (73). La fijación libre de nitrógeno atmosférico es un mecanismo efectivo para el aumento del área foliar en comparación con la aplicación de fertilizantes nitrogenados (79,74)

El trabajo realizado por Salazar en 2017 muestra la producción de sideróforos por las cepas empleadas y (75) afirma que dicha producción favorece la captación de hierro por parte de las plantas, evitando que sufran de clorosis férrica. En nuestro trabajo, las plantas sometidas a estos tratamientos presentaron mayor vigor y pigmento en sus hojas, comparadas con las plantas control. Las plantas que fueron tratadas con fertilización química presentaron clorosis y debilidad en sus hojas, posiblemente debido a la baja disponibilidad de hierro (75).

7.3.2. Longitud del tallo

La longitud del tallo se vio influenciada directamente por la producción de reguladores de crecimiento, tal como se muestra en la Figura 9C, donde en la décima semana, las plantas tratadas con *Azotobacter chroococcum* (C4T) y *Azotobacter* sp. (C2Br), presentan una diferencia significativa con respecto al control. Se ha demostrado que el género *Azotobacter* sp. es productor de grandes cantidades de Auxinas como el ácido indolacético, giberelinas y citoquininas, especialmente *Azotobacter chroococcum* (52 ,76). La aplicación de AIA en las raíces, aumenta la longitud de la raíz y la elongación del tallo (77). Según Rajae y colaboradores en el 2007, el mayor crecimiento de las plantas se observó bajo los tratamientos con *Azotobacter* sp. de mayor producción de AIA. (78)

Los resultados de este estudio evidencian que 4 semanas después de la siembra, las plantas inoculadas con C4T alcanzan el doble del tamaño de las plantas control. En un estudio realizado por Serna-Cock y colaboradores en 2011 (79), se evaluó el efecto de la inoculación con diferentes microorganismos incluido *Azotobacter chroococcum* y se observó que la actividad PGPR se evidencia a los 30 días de siembra.

En otro trabajo realizado por Stewart (80), se observó que las plantas a las cuales se les suministró fertilizante comercial presentaron la mayor longitud del tallo, debido a la adición de nutrientes al suelo y por tanto a las plantas, aumentando así su crecimiento y con esto la productividad del cultivo.

El fertilizante comercial empleado en este estudio, corresponde a un compuesto mezclado NPK reforzado con microelementos quelatados que se encuentran de manera disponible para ser absorbidos por la planta, ya que las elevadas concentraciones de micronutrientes no quelatados pueden interferir con la absorción de hierro (81)

7.3.3. Crecimiento de la raíz

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en la longitud de la raíz en los diferentes tratamientos, el peso seco sí mostró diferencias significativas (< 0.05) durante el periodo de evaluación. Varios autores reportan que el aumento en el peso radicular está relacionado con el contenido de nitrógeno disponible, resultado de los procesos de fijación libre llevados a cabo por las bacterias diazótroficas presentes, lo que conlleva a una mayor acumulación de nitrógeno en la planta (62,83,84,85).

Estudio realizado por Valetti y colaboradores en 2018 (86), sugieren que el aumento en el peso seco radicular en plantas de canola se ve influenciado positivamente por la capacidad de *Azotobacter* sp. de solubilizar el fosfato insoluble presente en el sustrato empleado. En nuestro estudio, se observó que las plantas tratadas con fertilizante químico presentaron valores similares en el peso radicular con respecto a las inoculadas con las cepas C4T y C2Br, sin embargo, se encuentra documentado que la inoculación del suelo o sustratos agrícolas con cepas de *Azotobacter* sp. reemplazando el uso de fertilizantes con alto contenido de fósforo previene el deterioro del suelo y la eutrofización de las fuentes de agua (88).

7.3.4. Biomasa vegetal

Se ha observado que las plantas inoculadas con biofertilizantes que incluyen *Azotobacter* sp. como microorganismo promotor del crecimiento vegetal, presentan aumentos significativos tanto en el peso fresco como en el peso seco. Como mencionamos anteriormente, esto debido a la fijación libre de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, producción de AIA, entre otras, mediada por la acción de los microorganismos implicados (86,87), conduciendo a un mayor rendimiento en la producción vegetal.

En las plantas que fueron sometidas a fertilización química, se observó un aumento en la longitud del tallo con respecto a las cepas de estudio, sin embargo, también se evidenció una disminución en el número de hojas y marchitez en las mismas dado que como se mencionó anteriormente estaban sufriendo de clorosis. Las plantas inoculadas con las cepas de estudio presentaron una diferencia significativa en la biomasa con respecto a las plantas control ya que la capacidad diazótropa de las bacterias promueve el crecimiento disminuyendo la necesidad de emplear fertilización química, toda vez que hay estudios que

demuestran que incluso combinando fertilización química con biofertilización no se obtienen resultados tan alentadores como cuando se emplea únicamente tratamiento microbiano (33).

Estudios previos sobre el género *Azotobacter* sp. realizados en la Unidad de Investigaciones Agropecuarias UNIDIA, indicaron la capacidad de las cepas empleadas (C4T y C2Br) para de forma *in vitro*, fijar libremente el nitrógeno, producir AIA, solubilizar fósforo y producir sideróforos. Esto sumado a nuestros resultados, demuestra que las cepas C4T y C2Br son microorganismos promisorios para ser empleados como biofertilizantes. Se demostró de forma *in vivo* su potencial PGPR, evidenciando que las plantas sometidas a la inoculación bacteriana presentaron un aumento en la elongación del tallo, número de hojas, peso fresco, peso seco de la raíz y peso seco de la parte aérea.

Conclusiones

- Se realizó la curva de crecimiento de las cepas de *Azotobacter* sp. C4T y C2Br en caldo nutritivo y se determinó la fase exponencial desde las 17 hasta las 41 horas .
- El porcentaje de germinación *in vitro* e *in vivo* de semillas de tomate de la variedad chonto Santa Clara con las cepas de *Azotobacter* C4T y C2Br, aumentó un 18% y 13% respectivamente, comparado a las semillas del control.
- Se demostró un aumento significativo en los parámetros de crecimiento como: número de hojas, longitud del tallo, radicular y peso seco, producto de la inoculación con las dos cepas de *Azotobacter*.
- Los resultados derivados de este trabajo, sumado a los obtenidos en trabajos previos, permiten suponer que las cepas de *Azotobacter* C4T y C2Br son promisorias para su uso como biofertilizante. en cultivos hortícolas.

Referencias

1. Armenta D, García C, Camacho R, Apodaca MA, Gerardo L, Nava E. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 2010;6(1):51–6.
2. Ojanama G, Gastón C, Armas F. Efectos de los fertilizantes químicos en el suelo por producción de arroz. *Univ Peru Unión* [Internet]. 2005;3.
3. Miransari M. *Soil nutrients*. New York: Nova Science Publishers; 2012. 297-304 p.
4. Luna Geller LA. Producción, uso y manejo de bioestimulantes, abonos orgánicos, acondicionadores, y biofertilizantes a partir de fuentes no convencionales [Internet]. 2001. p. 58.
5. DANE. Boletín técnico Exportaciones. 2018;1–31.
6. Vallejo Cabrera FA. Características generales de los cultivos hortícolas de Colombia. 1994;44(1–4):9–10.
7. Mantilla CL, Pahola L, Támara G, Zumaqué LEO. Efecto biofertilizante del preparado: residuos vegetales-bacteria nativa diazotrofa, sobre las variables biométricas en plántulas de *Rhapanus sativus*. *Rev Colomb Biotecnol*. 2011;XIII(1):156–62.
8. Cvijanović G, Dozet O, Đukić V, Đurić N. The importance of biofertilizers in sustainable production of corn, wheat and soybean. *Compet Agro - Food Environ Econ*. 2015;220–5.
9. Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility , plant tolerance and crop productivity Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility , plant tolerance and crop pr. 2014;13(1):1–10.
10. Melorose J, Perroy R, Careas S. Fertilizantes biológicos. *Statew Agric L Use Baseline* 2015. 2015;1:125–31.
11. Khan MR, Khan SM. Biomanagement of Fusarium wilt of tomato by the soil application of certain phosphate-solubilizing microorganisms. *Int J Pest Manag*. 2001;47(3):227–31.
12. Brutti L, Alvarado P, Rojas T, Martensson A. Tomato seedling development is improved by a substrate inoculated with a combination of rhizobacteria and fungi. 2015;65(2):170–6.
13. Battini K, Kasa P, Modugapalem H. Isolation, screening, and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolates of *Azotobacter* and *Trichoderma* and their beneficial activities. *J Nat Sci Biol Med* [Internet]. 2015;6(2):360.

14. Probanza A, Mateos JL, Lucas García JA, Ramos B, de Felipe MR, Gutierrez Mañero FJ. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. Growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. *Microb Ecol.* 2001;41(2):140–8.
15. Hossain MM, Sultana F, Hyakumachi M. Role of ethylene signalling in growth and systemic resistance induction by the plant growth-promoting fungus *Penicillium viridicatum* in *Arabidopsis*. *J Phytopathol.* 2017;165(7–8):432–41.
16. Lara Mantilla C, Villalba Anaya M, Oviedo Zumaque LE. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Rev Colomb Biotecnol [Internet].* 2007;9(2):6–14.
17. Obando M, Rivera D, Bonilla R. Respuesta Fisiológica a la Fertilización por *Azotobacter chroococcum* AC1 y Fertilización Nitrogenada de Síntesis Sobre el Maíz (*Zea mays* L.) en Invernadero. *BioTecnología [Internet].* 2013;17(1):1–23.
18. Xin M. Study on potencial of *Bacillus* Spp. and *Pseudomonas* Spp. PGPR in promoting plant growth and controlling disease. *Oxid Commun.* 2017;20(2):731–42.
19. Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014;106(1):85–125.
20. Middendorf D, Juadjur A, Bindrich U, Mischnick P. AFM approach to study the function of PGPR's emulsifying properties in cocoa butter based suspensions. *Food Struct.* 2015 Apr;4:16–26.
21. Fatnassi IC, Chiboub M, Saadani O, Jebara M, Jebara SH. Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. *C R Biol.* 2015 Apr;338(4):241–54.
22. Castillo G, Altuna B, Michelena G, Sánchez Bravo J, Acosta Echeverría M. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *An Biol ISSN 1138-3399, ISSN-e 1989-2128, N° 27, 2005, págs 137-142.* 2005;(27):137–42.
23. Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2007;26(5–6):227–42.
24. Sexanan A, Tilak K. Free living nitrogen fixers: their role in crop productivity. *Microbes Heal wealth Sustain Environ Malhotra.* 1998;25–46.
25. Bultreys A, Gheysen I, Maraite H, de Hoffmann E. Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains

- and their potential use in strain identification. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Apr;67(4):1718–27.
26. Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Aug;68(8):3795–801.
 27. Canto-Martin J., Medina-Peralta S, Morales Avelino D. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Azospirillum* sp. EN PLANTAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacquin). *Trop Subtrop Agroecosystems*. 2004;4:21–7.
 28. Bhattacharyya P, Jha D. Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR): emergencia en la agricultura. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012;28:1327–50.
 29. Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CLL, Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*. 2015;5(4):355–77.
 30. Mrkovački N, Bjelić D, Đalović I, Šeremešić S, Milošev D. Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on dynamics of the number of microorganisms in the rhizosphere of maize. *J Agric Biol Sci*. 2016;632:45–53.
 31. Rizvi A, Khan MS. Heavy metal induced oxidative damage and root morphology alterations of maize (*Zea mays* L.) plants and stress mitigation by metal tolerant nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;157(January):9–20.
 32. León LH, Rojas LM. Determination of plant growth promoting potential of *Azotobacter* spp. isolated from the rhizosphere of weeds in maize crop (*Zea mays* L.). *Sci Agropecu [Internet]*. 2015;6(4):247–57.
 33. Romero-Perdomo F, Abril J, Camelo M, Moreno-Galván A, Pastrana I, Rojas-Tapias D, et al. *Azotobacter chroococcum* como biofertilizante bacteriano potencialmente útil para el algodón (*Gossypium hirsutum* L.): efecto en la reducción de la fertilización nitrogenada. *Rev Argent Microbiol [Internet]*. 2017;49(4):377–83.
 34. Cano MA. Interacción de microorganismo benéficos en lantás: Micorrizas , *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *RevUDCA Act e Div Cient*. 2011;14(2):15–31.
 35. Nosheen A, Bano A, Ullah F. Bioinoculants: A sustainable approach to maximize the yield of Ethiopian mustard (*Brassica carinata* L.) under low input of chemical fertilizers. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(2):270–7.

36. Ordookhani K, Zare M. Effect of pseudomonas, azotobacter and arbuscular mycorrhiza fungi on lycopene, antioxidant activity and total soluble solid in tomato (*Lycopersicon esculentum* F1 hybrid, Delba). *Adv Environ Biol.* 2011;5(6):1290–4.
37. Zare M, Ordookhani K, Alizadeh O. Effects of PGPR and AMF on growth of two bred cultivars of tomato. *Adv Environ Biol.* 2011;
38. Brown M, Carr G. Interactions between *Azotobacter chroococcum* and vesicular-arbuscular mycorrhiza and their effects on plant growth. *J Appl Bacteriol.* 1984;56:429–37.
39. Chatterjee R. Influence of nutrient sources on growth, yield and economics of organic lettuce production under foothills of eastern Himalayan region. *Emirates J Food Agric.* 2015;27(5):460–2.
40. Cámara de comercio de Bogotá. Manual Lechuga [Internet]. Programa de apoyo agrícola y agroindustrial vicepresidencia de fortalecimiento empresarial cámara de comercio de Bogotá. 2015 [cited 2018 Apr 14].
41. Ureña Huizar A, Campoverde Gutierrez P. Efecto de biofertilizantes en la producción de Lechuga. Univ Michoacana San Nicolás Hidalgo. 2010;
42. Mejía S, Estrada E, Franco M. Respuesta del tomate chonto cultivar Unapal Maravilla, a diferentes concentraciones de nutrientes. *Acta Agron.* 2007;56(2):75–83.
43. Productores de Hortilizas. Plagas y Enfermedades del Tomate. Supl Espec [Internet]. 2006;Guía de Id:23.
44. Escobar H, Lee R. Manual de producción de tomate bajo invernadero. 2nd ed. Vol. 1, Manual de producción de tomate bajo invernadero. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 2009. 180 p.
45. Allende M, Salinas L, Rodríguez F, Olivares N, Riquelme J, Antúñez A, et al. Manual de cultivo del tomate bajo invernadero. 2017;112.
46. DANE. El cultivo del tomate de mesa bajo invernadero , tecnología que ofrece mayor producción , calidad e inocuidad del producto. 2014.
47. Corpoica. Uso de microorganismos con potencial como biofertilizantes en el cultivo de mora. Roveda G, Cabra L, Ramirez M, editors. 2008.
48. Board N. The Complete Technology Book on Biofertilizer and Organic Farming. 2nd ed. Nagar K, editor. 2012.
49. Kumar A, Sharma S, Mishra S. Evaluating effect of arbuscular mycorrhizal fungal consortia and *Azotobacter chroococcum* in improving biomass yield of *Jatropha curcas*. *Plant Biosyst.* 2016;150(5):1056–64.

50. Sharifi RS, Namvar A, Sharifi RS, Sharifi RS, Namvar A, Sharifi RS. Grain filling and fatty acid composition of safflower fertilized with integrated nitrogen fertilizer and biofertilizers. *Pesqui Agropecuária Bras.* 2017 Apr;52(4):236–43.
51. Jiménez DJ, Montaña JS, Martínez MM. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2011;42(3):846.
52. Quintero C. Evaluación de la producción de ácido indol acético (AIA) y fijación libre de nitrógeno en cepas nativas de *Azotobacter* sp. aisladas de suelos del altiplano cundiboyacense. Pontificia Universidad Javeriana; 2016.
53. Salazar D. Producción de sideróforos por cepas de *Azotobacter* spp. aisladas de suelos de cultivos hortícolas del altiplano cundiboyacense. Pontificia Universidad Javeriana; 2017.
54. Borda D, Pardo JM, Montaña JS, Martínez MM. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert / Bio-fertilizer production from an isolate of *Azotobacter nigricans* obtained from a plantation of *Stevia rebaudiana* Bert. *Univ Sci* [Internet]. 2009;14(1):71.
55. Bécquer C et al. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase II: invernadero. *Rev Mex Ciencias Agrícolas.* 2012;3(5):985–97.
56. Jaramillo VP, Rodríguez M, Guzmán A M, Zapata C T, Rengifo M JN, Jaramillo N JE. Buenas Prácticas Agrícolas (Bpa) Bajo Condiciones Protegidas [Internet]. 2007. 316 p.
57. Ashraf M, Ahmad MSA, Öztürk M, Aksoy A. Crop production for agricultural improvement. *Crop Prod Agric Improv.* 2012;9789400741(May 2014):1–796.
58. Mateus Maldonado JF. Determinación del potencial biofertilizante de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. con base en la capacidad fijadora de nitrógeno y solubilización de fosfato. 2016;
59. Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD. Bacterial alginate: Physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56(3–4):315–25.
60. Owlia P, Nosrati R, Saderi H, Olamaee M, Rasooli I, Akhavian Tehrani A. Correlation between nitrogen fixation rate and alginate productivity of an indigenous *Azotobacter vinelandii* from Iran. *Iran J Microbiol.* 2012;4(3):153–9.
61. Niño Camacho L, Torres Saenz R. IMPLEMENTACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA BACTERIANA

- DE CEPAS *Pseudomonas putida* BIODEGRADADORAS DE FENOL. Escuela de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander. 2010.
62. Mahato P, Badoni A, Chauhan J. Effect of Azotobacter and Nitrogen on Seed Germination and Early Seedling Growth in Tomato. 2009;1(4):62–6.
 63. Reddy S, Singh AK, Masih H, Benjamin JC, Ojha SK, Ramteke PW, et al. Effect of Azotobacter sp and Azospirillum sp on vegetative growth of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). 2018;7(4):2130–7.
 64. Ibiene A, Agogbua J, Okonko I, Nwachi G. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizer: Effect on growth of *Lycopersicum esculentus*. J Am Sci. 2012;88(22):318–24.
 65. Pathak D V, Singh S, Saini RS. Impact of bio-inoculants on seed germination and plant growth of guava (*Psidium guajava*). 2013;1(1):15–7.
 66. Shoebitz M, Ribaudó CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Curá JA. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. Soil Biol Biochem. 2009;41(9):1768–74.
 67. Masciarelli O, Urbani L, Reinoso H, Luna V. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. J Microbiol. 2013;51(5):590–7.
 68. Adekiya AO, Agbede TM. Growth and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) as influenced by poultry manure and NPK fertilizer. Emirates J Food Agric. 2009;21(1):10–20.
 69. Stein LY, Klotz MG. The nitrogen cycle. Curr Biol [Internet]. 2016;26(3):R94–8.
 70. Aristizabal F, Cerón L. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Rev Colomb Biotecnol. 2012;14(2012):10–1.
 71. Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, Saxena AK, Nautiyal CS, Mittal S, et al. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Spec Sect Microb Divers. 2005;
 72. Mahato S, Kafle A. Comparative study of Azotobacter with or without other fertilizers on growth and yield of wheat in Western hills of Nepal. Ann Agrar Sci [Internet]. 2018;(January).
 73. Lee YJ, Yang CM, Chang KW, Shen Y. Effects of nitrogen status on leaf anatomy, chlorophyll content and canopy reflectance of paddy rice. Bot Stud. 2011;52(3):295–303.

74. Vijayan K, Chakraborti SP, Ghosh PD. Foliar application of *Azotobacter chroococcum* increases leaf yield under saline conditions in mulberry (*Morus* spp.). *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2007;113(3):307–11.
75. Kong D, Chen C, Wu H, Li Y, Li J, Ling HQ. Sequence diversity and enzyme activity of ferric-chelate reductase LeFRO1 in Tomato. *J Genet Genomics*. 2013;40(11):565–73.
76. Zhang H, Wang B, Xu M. Effects of inorganic fertilizer inputs on grain yields and soil properties in a long-term wheat-corn cropping system in South China. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 2008;39(11–12):1583–99.
77. Mehboob I, Naveed M, Zahir ZA. Rhizobial association with non-legumes: Mechanisms and applications. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 2009;28(6):432–56.
78. Harari, A., Kigel, J., and Okon, Y. 1988. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant Soil* 110: 275– 282
79. S. Rajaei, H. A. Alikhani, F. Raiesi. Effect of Plant Growth Promoting Potentials of *Azotobacter chroococcum* Native Strains on Growth, Yield and Uptake of Nutrients in Wheat . *JWSS*. 2007; 11 (41) :285-297
80. Serna-Cock L, Arias-Garcia C, Hernandez LJV. EFECTO DE LA BIOFERTILIZACION SOBRE EL CRECIMIENTO EN MACETA DE PLANTAS DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*). *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial*. 2011;9(2):85–95.
81. Stewart WM, Dibb DW, Johnston AE, Smyth TJ. The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production. *Agron J*. 2005;97(1):1–6.
82. Sanz M, Sánchez-Sánchez, Antonio Cerdán M. Nutrición férrica de los cultivos. 2015;
83. Martinez R, Dibut B, Gonzalez R. Stimulation of tomato development and yield by inoculation of red ferrallitic soils with *Azotobacter chroococcum*. In: *Memorias-11th-Congress-Latinoamerican-de-da-suelo*. 1993. p. 1396–8.
84. Mohandas S. Field response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill 'Pusa Ruby') to inoculation with a VA mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and with *Azotobacter vinelandii*. *Plant Soil [Internet]*. 1987;98(2):295–7.
85. Sabannavar SJ, Lakshman HC. Synergistic Interactions among *Azotobacter*, *Pseudomonas*, and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Two Varieties of *Sesamum Indicum* L. *Commun Soil Sci Plant Anal [Internet]*. 2011;42(17):2122–33.

86. Valetti L, Iriarte L, Fabra A. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Appl Soil Ecol.* 2018;132(August):1–10.
87. Tahir M, Aqueel M. Pakistan Journal of Life and Social Sciences Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Budding Complement of Synthetic Fertilizers for Improving Crop Production. *Pakistan, Life Soc Sci.* 2013;11:1–7.
88. Ledesma C, Bonansea M, Rodriguez CM, Delgado ARS. Determinación de indicadores de eutrofización en el embalse Río Tercero, Córdoba (Argentina). *Rev Cienc Agron.* 2013;44(3):419–25.

ANEXOS

Anexo 1. Composición turba

Composición
Turba de sphagnum canadiense (fina granulación 65-75 %/Vol)
Vermiculita - Fina granulación
Micronutrientes
Cal dolomita y Calcítica
Agente Humectante

Anexo 2. Análisis estadístico entre réplicas

	A	B	C	Promedio	DS
C4T	13	12	12	12,33333333	0,57735027
C2Br	13	10	8	10,33333333	2,51661148
Control	10	10	8	9,33333333	1,15470054
Fertilizante	12	9	7	9,33333333	2,51661148

Anexo 3. Análisis estadístico anova – porcentaje de germinación

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i·	FV	SC	GL	CM	Fcalc	Fteo	
C4T	86,67	80,00	80	246,667	3	82,222	ANOVA	Tipo	800	3	266,666667	1,6744186	0,24876367
C2Br	86,67	66,67	53,33	206,667	3	68,889		Error	1274,07407	8	159,259259		Decisión
CONTROL	66,67	66,67	53,33	186,667	3	62,222		Total	2074,07407	11	188,552189		No Diferencia
FERTILIZANTE	80	60	46,67	186,667	3	62,222							
	tot	tot	tot	826,667	12	68,889							

Anexo 4. Análisis estadístico anova – número de hojas

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i·	FV	SC	GL	CM	Fcalc	Fteo	
C4T	6	6	5	17	3	5,66666667	ANOVA	Tipo	76,33333333	2	38,16666667	32,203125	4,25649473
C2Br	7	5	8	20	3	6,66666667		Error	10,66666667	9	1,18518519		Decisión
CONTROL	2	4	4	10	3	3,33333333		Total	87	11	7,90909091		Diferencia
FERTILIZANTE	11	9	11	31	3	10,33333333							
	tot	tot	tot	78	12	6,5							

Anexo 5. Análisis estadístico anova – longitud de raíz

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i·	FV	SC	GL	CM	Fcalc	Fteo	
C4T	2,3	2,8	5,7	10,8	3	3,6	ANOVA	Tipo	6,60916667	2	3,30458333	2,74534615	4,256494729
C2Br	5	2,8	4	11,8	3	3,93333333		Error	10,83333333	9	1,2037037		Decisión
CONTROL	2	3	1,5	6,5	3	2,16666667		Total	17,4425	11	1,58568182		No Diferencia
FERTILIZANTE	4	4,5	3,5	12	3	4							
	tot	tot	tot	41,1	12	3,425							

Anexo 6. Análisis estadístico anova – Longitud de tallo

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i.	FV	SC	GL	CM	Fcalc	Fteo
C4T	5,3	5,3	4,3	14,9	3	4,96666667	Tipo	48,8566667	2	24,4283333	19,3307444	4,25649473
C2Br	5,5	4,1	7	16,6	3	5,53333333	Error	11,3733333	9	1,2637037		Decisión
CONTROL	4	3	3,5	10,5	3	3,5	Total	60,23	11	5,47545455		Diferencia
FERTILIZANTE	11	8	8	27	3	9						
	tot	tot	tot	69	12	5,75						

Anexo 7. Análisis estadístico anova – Peso húmedo

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i.	FV	SC	GL	CM	Fcalc	Fteo
C4T	0,45	0,54	0,52	1,51	3	0,5033333	Tipo	1,8576667	2	0,9288333	326,542969	4,25649473
C2Br	0,73	0,79	0,82	2,34	3	0,78	Error	0,0256	9	0,0028444		Decisión
CONTROL	0,05	0,08	0,07	0,2	3	0,0666667	Total	1,883267	11	0,17120606		Diferencia
FERTILIZANTE	1,24	1,06	1,13	3,43	3	1,1433333						
	tot	tot	tot	7,48	12	0,6233333						

Anexo 8. Análisis estadístico anova – Peso seco total

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i.	FV	SC	GL	CM	Fcalc	Fteo
C4T	0,0676	0,0549	0,0598	0,1823	3	0,06076667	Tipo	0,03431054	2	0,01715527	21,0360678	4,25649473
C2Br	0,0079	0,0077	0,0105	0,0261	3	0,0087	Error	0,00733965	9	0,00081552		Decisión
CONTROL	0,0079	0,0077	0,0105	0,0261	3	0,0087	Total	0,0416502	11	0,00378638		Diferencia
FERTILIZANTE	0,2074	0,1177	0,093	0,4181	3	0,13936667						
	tot	tot	tot	0,6526	12	0,05438333						

Anexo 9 Análisis estadístico anova – Peso seco raíz

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i.	FV	SC	G L	CM	Fcalc	Fteo
C4T	0,018	0,015	0,019	0,053	5	0,0178666	Tipo	0,0090507	2	0,0045253	5,0854976	4,2564947
	3	3	8	6	3	7		1	2	5	7	3
C2Br	0,001	0,001	0,002	0,005	9	0,0019	Error	0,0080086	9	0,0008898		Decisión
	6	6	2	7	3	0,0019		9	9	5		
CONTROL	0,001	0,001	0,002	0,005	9	0,0019	Total			0,0015508		Diferencia
	6	6	2	7	3	0,0019		0,0170594	11	5		
FERTILIZANTE	0,141	0,037	0,027	0,206	6	0,0688333						
	6	7	2	5	3	3						
				0,271	1							
	tot	tot	tot	5	2	0,022625						

Anexo 10 Análisis estadístico anova – Peso seco aéreo

	A	B	C	Yi.	n	Ybarra i-	FV	SC	GL	CM	Fcalc	Fteo
C4T	0,04			0,12								
	91	0,0396	0,04	87	3	0,0429	Tipo	0,00862042	2	0,00431021	195,006039	4,25649473
C2Br	0,00		0,00	0,02			Error	0,00019893	9	2,2103E-05		Decisión
	6	0,0061	83	04	3	0,0068	Total	0,00881935	11	0,00080176		Diferencia
CONTROL	0,00		0,00	0,02								
	6	0,0061	83	04	3	0,0068						
FERTILIZANTE	0,06		0,06	0,21								
	58	0,08	58	16	3	0,07053333						
				0,38								
	tot	tot	tot	11	12	0,03175833						