



Evaluación del efecto de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (BAFEs) y pseudomonados fluorescentes sobre el crecimiento temprano de plántulas de cacao
(*Theobroma cacao*)

Yisel Ortega Mercado
Danny Yulieth Cañaverl Muñoz
Maira Liceth Zapateiro Rentería
Darly Griselly Torres Presiga

Trabajo de grado presentado para optar al título de Microbiólogo Industrial y Ambiental

Asesor
Carlos Neftaly Lozano Andrade, Magíster (MSc) en Biología

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología Industrial y Ambiental
Apartadó, Antioquia, Colombia
2021

Cita	(Ortega Mercado et al., 2021)
Referencia	Ortega Mercado, Y., (2021). <i>Evaluación del efecto de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (BAFEs) y pseudomonados fluorescentes sobre el crecimiento temprano de plántulas de cacao (Theobroma cacao)</i> [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, Apartadó, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Biblioteca Sede Apartadó

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: José Ricardo Velazco Vélez.

Jefe departamento: Natalia Valencia López.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Evaluación del efecto de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (BAFEs) y pseudomonados fluorescentes sobre el crecimiento temprano de plántulas de cacao (*Theobroma cacao*)

Yisel Ortega-Mercado¹ Maira L. Zapateiro-Renteria¹ Danny Y. Cañaveral-Muñoz¹
Darly G. Torres-Presiga¹ Carlos N. Lozano-Andrade²

¹ Estudiantes de Microbiología Industrial y Ambiental

² Asesor de proyecto de grado

Resumen

El cacao es una planta de gran importancia socio-económica en Colombia. Sus frutos y productos derivados son altamente demandados debido a sus propiedades nutricionales, sabor y aroma. La aplicación de productos de síntesis química ha sido la principal herramienta de manejo agronómico de los cultivos, permitiendo obtener rendimientos y productividades con cierto margen económico, sin embargo, estos agroquímicos pueden generar efectos adversos en el suelo y en los mismos cultivos. El uso de bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) ha emergido como una alternativa promisoriosa para reducir la aplicación de agroquímicos en múltiples cultivos de interés comercial. Este grupo de microorganismos, son conocidos por su efecto positivo en el desarrollo vegetal a través de diversos mecanismos. Existen pocas investigaciones donde se evalúe la respuesta del cacao a la inoculación con PGPR, por tal razón, en el presente trabajo se evaluó, a manera de prueba de concepto, la respuesta temprana de plántulas de cacao variedad trinitario a la inoculación con aislados nativos de dos grupos ampliamente reconocidos como PGPR: Pseudomonados fluorescentes y formadores de endosporas. En la fase de bioprospección se obtuvo una colección de catorce morfotipos, ocho correspondientes a BAFEs y cuatro a pseudomonados fluorescentes. Se evaluaron tres rasgos de forma *in vitro*: producción de AIA por el método de salkowski, solubilización de fosfato por método cualitativo y antagonismos por el método enfrentamiento dual. Los resultados *in vitro* mostraron que la frecuencia o producción de los rasgos fue mayor en los aislados clasificados como pseudomonados fluorescentes que en el grupo BAFEs. En el ensayo en invernadero, bajo el sistema de experimentación, la forma de inoculación, la concentración del inóculo y el periodo de tiempo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables evaluadas asociadas al crecimiento. Los resultados obtenidos sugieren en términos de este trabajo, que seleccionar aislados sobre la base de sus rasgos bioquímicos evaluados *in vitro*, no resulta eficaz durante las evaluaciones en planta.

Palabras claves: BAFEs, Pseudomonados, PGPR, AIA, Solubilización de fósforo.

1. Introducción

La especie *Theobroma cacao*, perteneciente a la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae, se subdivide en tres variedades: trinitario, forastero y criollo (Dostert et al., 2012). El cacao presenta un alto interés comercial debido a sus propiedades nutricionales y procesos post cosechas, de los que se obtienen diversos productos con alto valor agregado caracterizados por su excelso sabor y aroma (Arvelo et al., 2017). Costa de Marfil, Ghana y Ecuador son los principales productores a nivel mundial, alcanzando una producción global de 4843 millones de toneladas para el año 2020 (ICCO, 2021). Colombia, por su parte, produjo aproximadamente 63 mil toneladas en el año 2020, incrementando su producción cerca de un 6% en comparación al año anterior. Antioquia ocupa el segundo lugar después de Santander, con una producción de 5551 toneladas en el 2020 (Baquero, 2019; Fedecacao, 2020; ILAC et al., 2019; Min agricultura, 2020). En el ámbito social, la siembra de cacao juega un papel importante ya que se ha convertido en una alternativa de resocialización frente a la problemática del postconflicto y un cultivo clave para la PNIS (Plan Nacional Integral de Sustitución de cultivos ilícitos), vinculando a más de las 1070 familias a través de los establecimientos de viveros (Fedecacao, 2021). El aumento de la productividad implica múltiples retos para el sector cacaotero, los cuales están relacionados principalmente, con la estandarización del material vegetal, metodologías de siembra y manejo agronómico y fitosanitario, siendo estos dos últimos factores altamente limitantes, debido a que en los suelos donde se cultiva cacao en muchas ocasiones la disponibilidad de minerales es baja, las condiciones ambientales afectan directamente el desarrollo y producción de los cultivos, aumentando la incidencia de plagas y enfermedades (ICA, 2012). La aplicación de productos de síntesis química ha sido la principal herramienta de manejo agronómico de los cultivos, permitiendo rendimientos y productividades con cierto margen económico (Caviedes, 2010). Sin embargo, el uso constante de estos fertilizantes y plaguicidas, podría generar un efecto negativo en el ambiente y a su vez efectos secundarios en los cultivos, como: la presencia de residuos tóxicos en frutos, aumentos en costo de producción y resistencia de plagas y

enfermedades (Del puerto et al., 2014; Parnell et al., 2016). Por lo anterior se hace necesario la implementación de prácticas agrícolas más sostenibles, que permitan mantener la productividad y la calidad de los frutos con menores impactos sobre el medio ambiente y la salud humana (Etesami & Maheshwari, 2018). Dentro de estas estrategias, el uso de bacterias promotoras de crecimiento ha emergido como una de las alternativas más promisorias para reducir la aplicación de agroquímicos en múltiples cultivos de interés comercial. Este grupo de microorganismos, denominados PGPR (por sus siglas en inglés Plant growth-promoter rhizobacteria), son bien conocidos por su efecto positivo en el desarrollo vegetal a través de diversos mecanismos, destacándose cepas de los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Moreno et al., 2018). Las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal de manera directa o indirecta: La influencia directa está relacionada con la producción de metabolitos que facilitan la disponibilidad y absorción de los nutrientes esenciales para el desarrollo de estas, como: la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de fitohormonas, entre otros; mientras que los efectos indirectos están relacionados con la modificación del ambiente rizosférico y su ecología, actuando como agentes de biocontrol de fitopatógenos mediante la secreción de metabolitos bioactivos, producción de enzimas líticas y la inducción de resistencia (Patel et al., 2021; Adedeji et al., 2020). Uno de los grupos que más se ha destacado en las investigaciones de promoción de crecimiento vegetal son las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFEs), las cuales se caracterizan por ser bacilos Gram positivos con capacidad de formar endospora y producir moléculas quelantes, enzimas, fitohormonas y antibióticos con potencial biocontrolador de plagas y enfermedades, (Leal, 2017; Borrego, 2016). Por otro lado, el género *Pseudomonas* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, no formador de endospora, con capacidad de solubilizar fósforo, sintetizar AIA, producir sideróforos, ejercer actividad biocontroladora, fijar nitrógeno, entre otros (Moreno et al., 2018; Caviedes, 2010).

La respuesta a la inoculación de PGPR en diferentes cultivos ha sido ampliamente evaluada, mostrando incrementos significativos en el crecimiento y producción (Pereira et al., 2020; He et al., 2021; Li et al., 2020). Sin embargo, hay pocas investigaciones en plantas perennes como los cítricos, manzana, plátano, cacao, pino, entre otros ya que, la mayoría de estudios se han realizado en plantas anuales como arroz, tomate, maíz o trigo. (Benjumeda, 2017). Pese a su gran importancia económica y a la presión del mercado por frutos orgánicos, existen pocas investigaciones donde se evalúe la respuesta del cacao a la inoculación con PGPR o experiencias exitosas donde este grupo de bacterias hagan parte fundamental del manejo integrado del cultivo. Por tal razón, en el presente trabajo se evaluó, a manera de prueba de concepto, la respuesta temprana de plántulas de cacao variedad trinitario a la inoculación con aislados nativos de dos grupos ampliamente reconocidos como PGPR: pseudomonados fluorescentes y formadores de endospora.

2. Materiales y métodos

2.1 Aislamiento de BAFEs y pseudomonados fluorescentes

Para la obtención de los aislados bacterianos fueron colectadas muestras de suelo rizosférico a veinte centímetros de profundidad de cultivos de cacao de la variedad trinitario en el Municipio de Carepa, Antioquia. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Biología de la Universidad de Antioquia sede Apartadó donde se prepararon suspensiones seriadas de suelo tomando como muestra inicial 10 g en 90 mL de agua destilada estéril. Para el aislamiento de pseudomonados fluorescentes, las diluciones fueron sembradas en superficie en medio de cultivo King B. Luego, para el aislamiento de BAFEs, las suspensiones fueron sometidas a choque térmico a 80 °C durante 10 minutos y fueron sembradas en medio de cultivo TSA al 10% (Agar Tripteína de Soya). Para ambos grupos, las cajas fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas. Se realizaron tinciones diferenciales para las colonias que presentaron características morfológicas compatibles con las bacterias de interés en ambos medios de cultivo. Después de comprobarse la pureza de los microorganismos mediante la tinción de Gram,

se almacenaron en TSB con glicerol al 40% hasta su uso en experimentos subsecuentes, los aislados fueron rotulados a partir de sus características siendo MB para BAFEs y MP para pseudomonados fluorescentes.

2.2 Evaluación de rasgos fenotípicos asociados a la promoción de crecimiento vegetal (PGPR)

Para todos los aislados obtenidos en ambos medios se evaluó la presencia de rasgos fenotípicos como producción de ácido indol 3- acético, solubilización de fosfato inorgánico y actividad antagónica contra *Moniliophthora* sp. y *Fusarium* sp. Para esto, los aislados bacterianos fueron activados en medio de cultivo TSA para evaluar su viabilidad y pureza. Las colonias aisladas fueron usadas para las diferentes pruebas *in vitro* como se describe a continuación.

2.2.1 Producción de ácido indol 3- acético (AIA)

Para evaluar la capacidad de producir AIA de los aislados obtenidos, se empleó el método colorimétrico de Salkowski (Glickmann & Dessaux 1995). Una colonia de cada aislado fue transferida a un Erlenmeyer con TSB (Caldo Tripteína de Soya) suplementado con 500 µg/mL L-triptófano. Después de 72 horas de incubación a 120 rpm y 25 °C, los cultivos fueron centrifugados a 3250 rpm por 15 minutos. Del sobrenadante obtenido se tomó 1 mL y se mezcló con 4 mL de reactivo Salkowski en tubos de ensayo mantenidos en oscuridad por 20 minutos; pasado el tiempo de reacción, se tomaron mediciones de absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro. Con la curva estándar se estimó la concentración de AIA (ug/mL) producida por los morfotipos y el procedimiento para cada morfotipo fue analizado por triplicado.

2.2.2 Solubilización de fosfato inorgánico

Para la evaluación cualitativa de la capacidad para solubilizar fosfato, se tomó una colonia de cada aislado y se inoculó en medio sólido NBRIP (National Botanical Research

Institute's Phosphate), que contiene 0.5% de fosfato de calcio insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (George et al., 2015). Las placas se incubaron a 37°C por 7 días y se hicieron lecturas a los 3, 5 y 7 días, donde las presencias de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias se interpretan como la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico. Cada morfotipo fue evaluado por duplicado.

2.2.3 Actividad antagónica contra *Moniliophthora* sp. y *Fusarium* sp.

2.2.3.1 Aislamiento de *Moniliophthora* sp.

El aislamiento del hongo fitopatógeno se realizó a partir de mazorcas de cacao de la variedad ICS 60 obtenidas de un cultivo en el Municipio de Carepa, Antioquia, que presentaban síntomas y signos de moniliasis (protuberancias o tumores, micelio blanco y necrosis) (Correa et al., 2014). Posteriormente, trozos de tejido de la mazorca fueron cortados finamente en la zona de transición de los síntomas. Estos tejidos fueron desinfectados en superficie, sumergiéndose en hipoclorito de sodio al 1% durante 2 minutos, luego en alcohol al 70% por 1 minuto y lavados tres veces en abundante agua destilada estéril. Finalmente, los trozos fueron colocados en medio de cultivo PDA, se incubaron a temperatura ambiente y se revisaron hasta la aparición de colonias características del hongo. A partir de las cajas donde se obtuvo crecimiento, se procedió a purificar los aislados fúngicos mediante repiques sucesivos en PDA. y simultáneamente, se realizaron observaciones microscópicas con azul de lactofenol para identificar estructuras morfológicas típicas del hongo. Una vez se obtuvieron los aislados compatibles morfológicamente con *Moniliophthora* sp., se procedió a su preservación y almacenamiento para los experimentos posteriores. La conservación se realizó por la técnica suspensión en agua, y se preservaron a 8 °C hasta su uso.

2.2.3.2 Antagonismo por enfrentamiento dual en medio sólido de los aislados bacterianos frente a *Fusarium* sp. y *Moniliophthora* sp.

La actividad antagónica se evaluó de manera cualitativa mediante el método de enfrentamientos duales (Sanmartín et al., 2012). Para ello, los hongos *Moniliophthora* sp. previamente aislado y *Fusarium* sp., donado por el Laboratorio de Biología de la sede Apartadó de la Universidad de Antioquia, fueron sembrados en agar PDA durante 8 días a temperatura ambiente. A partir de estos cultivos, se extrajeron discos de 5 mm de cada uno de los fitopatógenos y fueron sembrados en el centro de la caja que contenía medio PDA. Luego, cuatro aislados bacterianos (pseudomonados fluorescentes o BAFEs) fueron sembrados aproximadamente a 4 cm del hongo (Ver Figura 1). Adicionalmente, las cajas sin inoculación bacteriana sirvieron como controles. Después de 72 horas de incubación, la actividad antagónica fue determinada con la presencia de halos de inhibición del crecimiento fúngico comparado con los controles. Cada aislado fue evaluado por duplicado a temperatura ambiente.

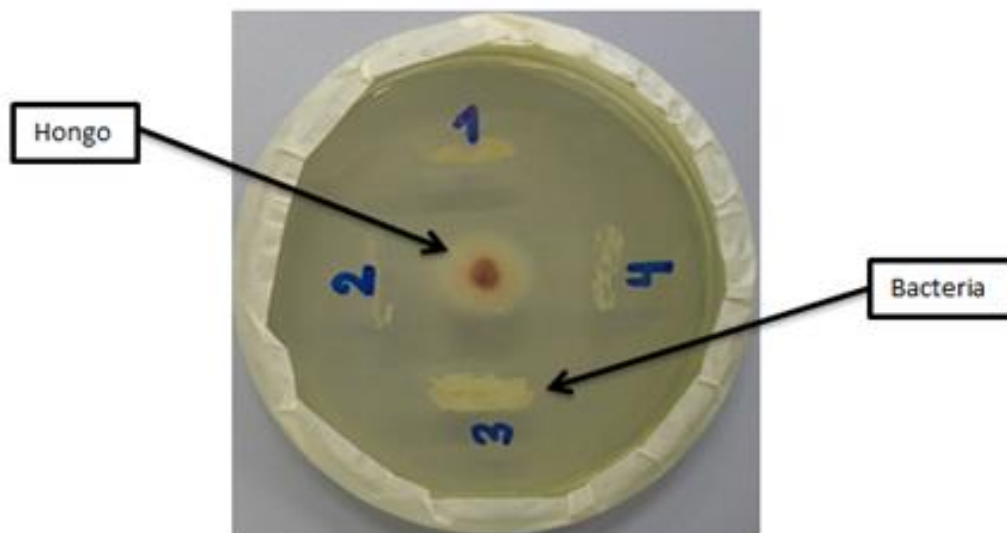


Figura 1: Esquema prueba de antagonismo in vitro por técnica de enfrentamiento dual. En este se observa la disposición de las bacterias evaluadas y el hongo fitopatógeno *Moniliophthora* sp. después de 36 horas de incubación.

2.3 Evaluación del efecto de los aislados sobre el crecimiento temprano en plántulas de cacao

2.3.1 Tratamiento pregerminativo y preparación del sustrato

Para determinar el efecto de los pseudomonados fluorescentes y BAFEs en el desarrollo temprano del cacao clon IMC 67, se condujo un experimento bajo condiciones de invernadero siguiendo los protocolos establecidos por Fedecacao (Fedecacao, 2015). Para esto, el mucílago de las semillas fue removido mediante lavados con aserrín, luego, fueron extendidas en hojas de iraca manteniendo la humedad hasta su germinación. Simultáneamente, el sustrato para la siembra fue preparado de acuerdo con las recomendaciones técnicas de Fedecacao de la siguiente manera: se mezclaron tres partes de limo de río, una parte de arena más la adición de una octava parte de cal para un total de 50 kg de sustrato. Una vez obtenida la mezcla homogénea, las unidades experimentales fueron preparadas en bolsas de almácigo que contenían 1 kilogramo del sustrato

2.3.2 Preparación de los inóculos bacterianos

La inoculación de las semillas se realizó con los aislados bacterianos que obtuvieron mejor desempeño en las pruebas *in vitro*; estos fueron activados a través de la metodología de agotamiento en agar TSA desde los cultivos primarios. Una vez se obtuvo suficiente biomasa, se prepararon soluciones de un volumen final de 100 mL a una escala Mcfarland de 2.0 de cada aislado y de una mezcla de todas las bacterias seleccionadas.

2.3.3 Inoculación de las semillas y montaje en invernadero

Las semillas germinadas fueron sumergidas por 20 minutos en las soluciones bacterianas previamente preparadas (numeral 2.3.2), a cada solución se le adicionaron diez semillas de forma independiente. Las unidades experimentales consistieron en 1 kg de sustrato en bolsas de almácigo, donde fueron sembradas las semillas previamente inoculadas, a 3 cm de profundidad en la parte central de las bolsas, adicionando en cada un 10 mL de las soluciones microbianas preparadas según el tratamiento correspondiente. El experimento se realizó utilizando un diseño experimental completamente aleatorizado, con siete tratamientos: los primeros cuatro consistieron en la evaluación individual de los aislados bacterianos con mejor desempeño en las pruebas *in vitro* (TMB y TMP, dependiendo del

caso); el quinto una mezcla de los aislados evaluados de forma individual (TLM) mezclando en proporciones iguales; el sexto fueron micorrizas como tratamiento comercial (TM) y finalmente, el séptimo tratamiento un control no inoculado (TC). Para cada tratamiento se realizaron siete réplicas. El montaje se realizó en condiciones de vivero con polisombra por un período de 3 meses en el corregimiento El Tres del municipio de Turbo-Antioquia, sector El Brandy. Durante este tiempo se realizaron labores de riego dos veces al día y, una vez finalizado el experimento, las plantas fueron trasladadas al laboratorio de Biología de la Universidad de Antioquía sede Apartadó, donde las raíces de las plantas fueron lavadas con abundante agua para retirar el exceso de suelo adherido y se procedió a medir las variables de crecimiento: diámetro del tallo, altura de la planta, longitud de la raíz principal, número de hojas, peso húmedo y peso seco.

2.4 Análisis estadístico

Se hicieron análisis descriptivos y se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA), luego de comprobar el supuesto de normalidad y homogeneidad de los datos. Debido a que no se cumplió con los supuestos se aplicó el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal- Wallis con un nivel de confianza de 95% mediante el programa Statgraphics. Los gráficos fueron realizados en software R-Studio.

3. Resultados

3.1 Aislados de Bacterias aeróbicas formadoras de endosporas y pseudomonados fluorescentes presentan rasgos asociados a la promoción de crecimiento vegetal

A partir de suelos de plantaciones de cacao de variedad trinitario colectado en el Municipio de Carepa, Antioquia, se obtuvo una colección de ocho bacterias con rasgos asociados a la promoción de crecimiento vegetal determinados de manera *in vitro*. Cuatro de los aislados obtenidos mediante choque térmico y crecimiento en medio TSA, se identificaron como bacilos Gram positivos con presencia de endospora, formada por

especies del género *Bacillus*. Los otros cuatro aislados seleccionados por presentar pigmento fluorescente en medio King B y bajo microscopia de campo claro, se observaron bacilos Gram negativos características del género *Pseudomonas*.

Bajo las condiciones experimentales, todo los aislados produjeron AIA cuando se evaluaron con la prueba colorimétrica de Salkowski, variando entre 0.75 hasta 59.4 $\mu\text{g/mL}$. En promedio, los pseudomonados fluorescentes tuvieron una producción media de $40.63 \pm 49.73 \text{ ug/mL}$, produciendo hasta 4.33 más veces que los aislados BAFEs, siendo el aislado MP1 el mayor productor con cerca de $59.4 \pm 18.75 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Por su parte, dentro de los aislados BAFE, que en promedio produjeron 4.48 ug/mL , destacó el morfotipo MB4 con cerca de 11.42 ug/mL después de 72 horas de incubación en medio TSB.

Tabla 1. Resultados de las pruebas fenotípicas asociadas al crecimiento vegetal evaluadas *in vitro*.

Grupos	Morfotipos	Solubilización de fosfato	Antagonismo		Producción de AIA (ug/mL)
			<i>Fusarium</i> sp.	<i>Moniliophthora</i> sp.	
BAFEs	MB1	Negativo	Negativo	Negativo	4.35 ± 1.47
	MB2	Negativo	Negativo	Negativo	0.75 ± 0.59
	MB3	Negativo	Negativo	Negativo	1.42 ± 1.25
	MB4	Positivo	Negativo	Negativo	11.40 ± 1.28
Pseudomonados fluorescentes	MP1	Positivo	Negativo	Positivo	59.42 ± 18.75
	MP2	Positivo	Negativo	Positivo	26.09 ± 22.43
	MP3	Positivo	Negativo	Positivo	36.73 ± 5.02
	MP4	Positivo	Negativo	Positivo	40.30 ± 14.12

Positivo: Capacidad de solubilización y capacidad antagónica

Negativo: No tiene capacidad de solubilización y no tiene capacidad antagónica

\pm : Desviación estándar.

Similar a la tendencia descrita para la producción de AIA, la frecuencia de aislados solubilizadores de fosfato fue más alta en los pseudomonados fluorescentes, donde todos los morfotipos presentaron solubilización de fósforo, el cual se pudo apreciar por la presencia de halos; para el caso de los aislados BAFEs, solo uno de los cuatro morfotipos presentó solubilización (Ver figura 2).

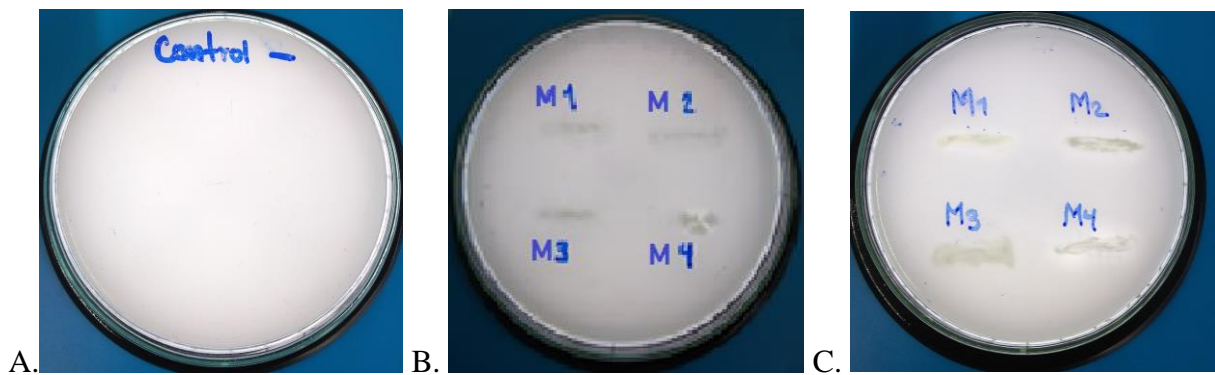


Figura 2. Resultados obtenidos en la prueba de solubilización de fosfato; A. Control, B. aislados de BAFEs, Aislados de pseudomonados fluorescentes.

Finalmente, todos los morfotipos aislados fueron enfrentados mediante prueba de antagonismo duales a los fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Moniliophthora* sp, agentes causales de las enfermedades de agallas y moniliasis, respectivamente. En las pruebas contra *Fusarium* sp. se encontró que ninguno de los aislados inhibió el crecimiento micelial del hongo, por el contrario, al entrar en contacto con las bacterias, *Fusarium* sp. creció sobre ellas. En los enfrentamientos duales contra *Moniliophthora* sp. se evidenciaron leves halos de inhibición para todos los pseudomonados fluorescentes mientras que ninguno de los aislados BAFEs suprimió el crecimiento micelial del hongo (Ver figura 3).

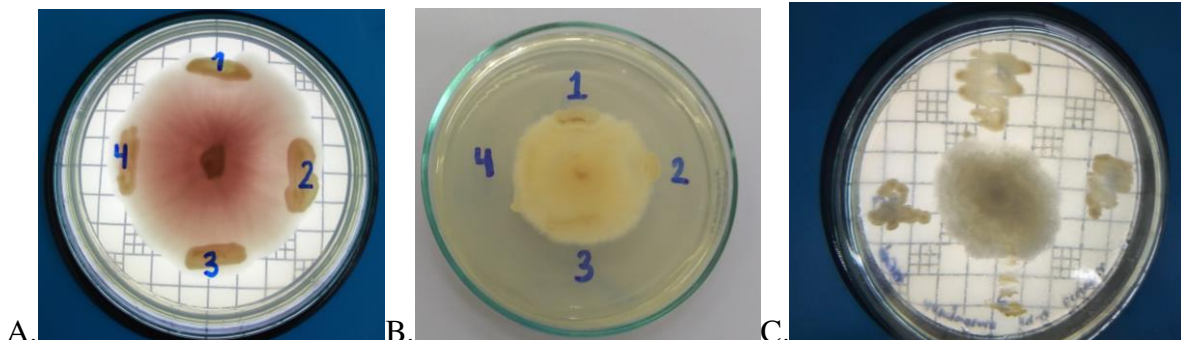


Figura 3. Resultados obtenidos en la prueba de antagonismo; A: Aislados del grupo BAFEs contra el *Fusarium* sp., B. Aislados del grupo BAFEs contra *Moniliophthora* sp. y C. Aislados del grupo pseudomonados fluorescentes contra *Moniliophthora* sp.

3.2 Efecto de los aislados de Bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (BAFEs) y pseudomonados fluorescentes sobre variables de crecimiento vegetativo.

Los aislados selectos fueron evaluados *in vivo* en su capacidad de promover el crecimiento de plántulas de cacao en invernadero. Se incluyeron 4 aislados bacterianos: MB1, MB4, MP1 y MP4, los cuales fueron seleccionados por presentar mejores rasgos PGPR *in vitro*. Derivado del análisis de los datos, se obtuvo que los tratamientos evaluados no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en ninguna de las variables asociadas al crecimiento del cacao evaluadas en este estudio, como se puede observar en la Figura 3. Aunque la variable de longitud radicular no se vio influenciada significativamente por la inoculación microbiana, es importante mencionar que se observó que en los tratamientos TMP1 Y TMP4 los pelos radiculares eran más abundantes en comparación a los otros tratamientos aplicados, sin embargo, la cantidad de raíces no se incluyó como variable de respuesta, ni se evaluó estadísticamente.

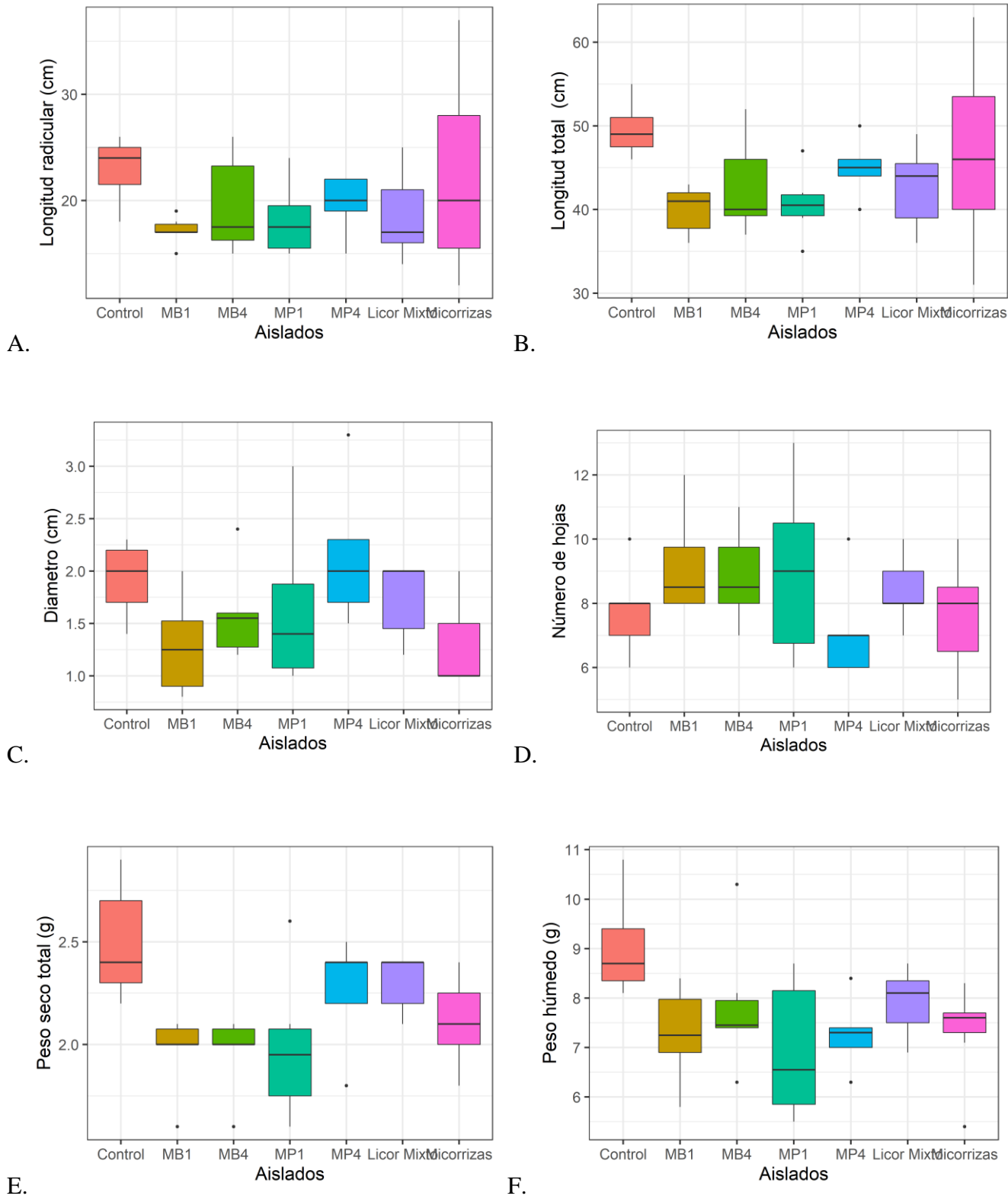


Figura 4. Efecto de los tratamientos microbianos evaluados sobre las variables de crecimiento vegetativo en plantas de cacao en etapa de vivero; donde: A. Longitud de la raíz, B. Longitud total, C. Diámetro del tallo, D. Numero de hojas, E. Peso seco, F. Peso húmedo.

4. Discusión

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación de aislados nativos sobre el crecimiento temprano en plántulas de cacao. El desarrollo experimental consistió en una estrategia tipo embudo, donde, a partir de una colección de cepas nativas, se seleccionaron los aislados que presentaron rasgos PGPR *in vitro* para ser evaluados en su capacidad de promover el crecimiento vegetal bajo condiciones de invernadero relevantes para el cacao (Posada et al., 2016; Corporación PBA, 2012).

En la fase de bioprospección se obtuvo una colección de doce morfotipos, ocho correspondientes a BAFEs y cuatro a pseudomonados fluorescentes. Independiente del tamaño de nuestra colección, esta tendencia es similar a la reportada por Villamil y Col, (2015) quienes encontraron que, en suelos y frutos de cacao, cultivados en Boyacá, hubo una mayor cantidad de especies del género *Bacillus* comparado con otros géneros, los cuales, además, mostraron actividad antagónica contra *M. royeri*. Las diferencias en la abundancia de BAFEs podría estar determinada por factores fisicoquímicos del suelo; Fierer & Jackson (2006) concluyeron en su trabajo que la estructura y composición de las comunidades bacterianas presentes en el suelo está determinada por factores como el pH, el cual a su vez está fuertemente relacionado con la disponibilidad de nutrientes. Otros estudios han demostrado que, en pH ácidos, el crecimiento de especies del género de *Pseudomonas* se ve limitado en contraste con *Bacillus* sp. que a un pH de 5 presenta un buen crecimiento (Osorio, 2012; Calvo et al., 2010). Teniendo en cuenta lo anterior, se pueden relacionar los resultados obtenidos con las características química de los suelos de Urabá, los cuales presentan un pH ácido debido a la presencia de aluminio, la aplicación de fertilizantes nitrogenados y la liberación de gases, producto de la transformación de la materia orgánica que se acumula en estos (Borrego, 2016; Rosas et al., 2017; Sánchez, 2012). El estudio fisiológico de las cepas de *Bacillus* que se realizó como parte del trabajo

de Jiménez y Col (2018) evidenció que los factores ambientales, como el pH y la temperatura, influyen directamente en la capacidad de crecimiento y en la actividad de biocontrol; además, en este estudio presentan resultados que aportan evidencia clara acerca de las condiciones ambientales para el crecimiento óptimo de la cepa BEB-8 (*Bacillus subtilis*) incluyen rangos de temperatura de 15 a 37 °C y de pH desde 5 hasta 8.

Cuando la colección bacteriana fue evaluada en su capacidad de producir rasgos *in vitro* asociados al crecimiento vegetal, se encontró que todos los aislados pertenecientes a pseudomonados fluorescentes presentaron actividad en las tres pruebas evaluadas; contrario al grupo de las BAFEs donde se observó actividad en solo dos pruebas (Producción de AIA y solubilización de fosfato), destacándose que para todas las pruebas, la frecuencia o producción de los rasgos fue mayor en los aislados clasificados como los pseudomonados fluorescentes que en el grupo BAFEs. Se ha reportado que los pseudomonados fluorescente y BAFEs presentan efectos benéficos en las plantas, que involucran mecanismos como, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas, la síntesis de sideróforos, el estímulo para la interacción con otros microorganismos benéficos como los rizobios y biocontroladores de patógenos (Gamez et al., 2019; Borrego, 2016); sin embargo, *Pseudomonas* sp. se destaca entre las PGPR por presentar gran versatilidad metabólica, utilizar varios mecanismos de solubilización, entre ellos, la producción de ácidos orgánicos y elevados niveles de enzimas fosfatasas (Ruiz, 2017). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son similares a los obtenidos por Caviedes (2010), en donde ninguno de los aislados de *Bacillus* sp. reportó capacidad de solubilizar fosfato tricálcico contrario a los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* spp. que si solubilizan en el medio SRS. De acuerdo con Duca y col (2014), *Pseudomonas* sp. presentó la capacidad de producir AIA mediante tres vías metabólicas diferentes, contrario al género *Bacillus* sp. que solo reporta la producción de AIA por la vía indol- 3-piruvato(IPA). Además, existe una vía alternativa en la que el triptófano se convierte directamente en IAAld por una enzima monooxigenasa de cadena lateral de

triptófano. La vía side chain oxidasa (TSO) se ha informado en bacterias como *Pseudomonas fluorescens* HP72, *P. fluorescens* CHA0 y *P. fluorescens* Pf-5 (Suzuki et al., 2003). En general de estos dos grupos de microorganismo se han reportado resultados promisorios en ensayos *in vitro*, sin embargo en los últimos años, múltiples autores han demostrado que los ensayos *in vitro* no son buenos predictores del efecto promotor de crecimiento en condiciones de invernadero o campo de acuerdo con Singh y Col. (2013), Ahmad y Col. (2008) y Zhender y Col. (1999), un resultado positivo de una prueba *in vitro* no garantizan que dicho rasgo se reproducirá en condiciones de campo, por lo tanto resulta importante una vez finalizada la etapa evaluativa en laboratorio probar el desempeño de los aislados en condiciones reales a las que están expuestas las plantas y los microorganismos.

En el ensayo en invernadero, bajo las condiciones establecidas y el periodo de tiempo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables evaluadas asociadas al crecimiento, cabe señalar que para la variable longitud de raíz el tratamiento MB1, presento valores pequeños en comparación al control, lo que en una aproximación podría sugerir que hay un efecto deletéreo con este tratamiento hacia el crecimiento de la raíz de la plántula, este efecto puede estar relacionado con la afinidad entre los componentes generados por ambos organismos, de acuerdo con Castro (2013) se podrían generar interacciones que reducen la germinación, crecimiento o desarrollo de la planta, lo que concuerda con los resultados obtenidos, en donde se observa que existe algunos tipos de interacciones entre la planta y la cepa que no resultan positivas para el correcto estímulo de la germinación. Los resultados obtenidos sugieren en términos de este trabajo, que seleccionar aislados sobre la base de sus rasgos bioquímicos evaluados *in vitro*, no resulta eficaz durante las evaluaciones en planta. Es importante considerar que durante la evaluación de mecanismos de acción de PGPR *in vitro*, la mayoría de los factores que afectan la actividad microbiana son controlados y, por lo tanto, distan mucho de las condiciones que afronta el inóculo *in vivo*, esto debido a que el suelo influirá en la

fisiología de las bacterias (Vilain et al., 2006). Existen algunos factores que pueden influir en la supervivencia y actividad de los microorganismos una vez son inoculados en el suelo, como la textura, la temperatura, la humedad, el pH, la cantidad de materia orgánica, la especie de planta inoculada y las interacciones con otras bacterias; este último es uno de los más importantes debido a que la bacteria debe llegar a ocupar un nicho, competir por nutrientes para mantener una población mínima capaz de ejercer su efecto promotor (Hipólito et al., 2017; Borrego, 2016). Otro factor a tener en cuenta es la baja cantidad de aislados que fueron probados en campo, puesto que en la mayoría de estudios las colecciones están conformadas por una gran cantidad de aislados los cuales son todos evaluados y solo un pequeño porcentaje de estos aislados logra tener un efecto significativo en la promoción de crecimiento, como se observó en el trabajo de Ramírez (2008) donde asilaron 230 morfotipos, de los cuales el 30% aproximadamente presentaron a nivel *in vitro* capacidades PGPR y solo *Burkholderia cepacia* UA156 y la *Pseudomonas putida* UA133 mostraron tener consistencia en los resultados a nivel de campo y laboratorio sobre el enraizamiento de esquejes de Crisantemo. Así mismo, el efecto de la concentración celular es un factor que suele pasarse por alto en las investigaciones, pero es fundamental para obtener resultados óptimos y eficaces. Según Bai y col (2002), la co-inoculación de PGPR en su dosis óptima aumenta el número de nódulos, el peso seco de la planta y el nitrógeno fijado. Respecto a los consorcios entre BAFEs y pseudomonados, Rojas et al., 2016 sustenta que al inocular combinaciones entre cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* no hubo una respuesta en el desarrollo de plantas de tomate verde, lo cual se debió a que algunas especies de estos géneros de microorganismos pueden ejercer un efecto represor en la expresión de los factores que intervienen en la promoción del crecimiento de la planta, lo que no ocurre al realizar la inoculación por separado, en donde las cepas de *B. thuringiensis* y *Pseudomonas* sp. mostraron diferencias significativas en la longitud de raíz y del hipocotilo respectivamente; caso similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

A partir de la información obtenida se proponen nuevos experimentos que comprendan nuevas variables de respuesta como el número de raíces, variables cualitativas como la coloración de la hojas, e insertar nuevos sistemas de tratamientos para inocular más veces las plántulas, además de aislar un mayor número de morfotipos (Cuellar, 2014; Bai, 2002; Canto et al., 2004; Castelblanco, 2018); otra recomendación está enfocada en una caracterización inicial de la microbiota asociada a los cultivos de cacao que se caracterizan por su capacidad de promover crecimiento vegetal.

5. Conclusiones

- Se obtuvo una colección de ocho morfotipos del grupo BAFEs y cuatro morfotipos del grupo de pseudomonados fluorescentes.
- Los aislados de pseudomonados fluorescentes mostraron capacidad de producir AIA, solubilizar fosfatos y antagonismo frente a *Moniliophthora* sp.
- No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, es decir los aislados bacterianos y las micorrizas no promovieron el crecimiento vegetal de cacao bajo las condiciones establecidas.
- Este trabajo sugiere que seleccionar aislados sobre la base de sus rasgos bioquímicos evaluados *in vitro* no resulta eficaz durante las evaluaciones en planta.

Bibliografía

- Adedeji, A. A., Häggblom, M. M., & Babalola, O. O. (2020). Sustainable agriculture in Africa: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to the rescue. *Scientific African*, 9, e00492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00492>
- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2196-0>

- Adu, M. O., Cobbinah, T., Asare, P. A., Yawson, D. O., & Taah, K. J. (2017). Demucilaging Freshly Stored Seeds of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Improves Seedling Emergence and Growth. *Journal of Botany*, 2017, 1938359. <https://doi.org/10.1155/2017/1938359>
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Arvelo, M., Gonzales, D., Maroto, S., & Montoya, P. (2017). *Manual Técnico del Cultivo de Cacao Prácticas Latinoamericanas*. https://agroavances.com/img/publicacion_documentos/BVE17089191e_1.pdf
- Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D. L., & Driscoll, B. T. (2002). Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(3), 230–238. <https://doi.org/10.1139/w02-014>
- Benjumeda Muñoz, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones*.
- Bonilla, I., Gárate, A., Azcón, J., & Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal* (S. de P. McGraw-Hill Interamericana de España : Universitat de Barcelona (ed.); 2nd ed.). <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetalAzcon.pdf>
- Borrego, D. (2016). *Evaluación de factores utiles para orientar la prospección de PGPR formadoras de endosporas en maiz. June*. <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/13442>

- Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., & Zúñiga, D. (2010). Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *41*(4), 899–906. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400008>
- Camelo R., M., Vera M., S. P., & Bonilla B., R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *12*(2), 159. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:227
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *14*(2), 15–31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>
- Canto, J., Medina, S., & D Morales. (2004). Efecto de la inoculación con *azospirillum* sp. en plantas de Chile habanero (*capsicum chinense jacquin*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *4*(1), 21–27.
- Carvajal, J. V, Valbuena, J., & Rosero, S. E. V. (2012). *In vitro* evaluation of Native Microorganisms for their Antagonism against *Moniliophthora roreri* Cif & Parin *Cocoa (Theobroma cacao L.)*.
- Caviedes, D. (2010). AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVO DE UCHUVA (*Physalis peruviana L.*) CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A *Fusarium oxysporum*. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8628/tesis588.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Ceballos, I. C. (2009). *Selección de bacterias aeróbicas formadoras de endospora aisladas de la filosfera de cultivares de Musa en el Urabá Antioqueño*. 135. <https://core.ac.uk/download/pdf/11052768.pdf%0A>
- Correa Alvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014). Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388–399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- Cuéllar, T. (2014). *Evaluación de la promoción de crecimiento del Bacillus subtilis EA-CB0575 en cultivos de banano, crisantemos y café*.
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., Torre, M. I. La, & Weigend, M. (2012). *Hoja botánica : Cacao Theobroma cacao L. December 2017*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31228.44165>
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85–125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- Emrin, G., Kumar, S. N., Jacob, J., Bommasani, B., Lankalapalli, R. S., Morang, P., & Kumar, B. S. D. (2015). Characterization of the bioactive metabolites from a plant growth-promoting rhizobacteria and their exploitation as antimicrobial and plant growth-promoting agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(2), 529–546. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1593-3>

- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Fedecacao. (2015). *Mejoramiento tecnologico del cultivo de cacao* (Fedecacao (ed.); 1st ed.).
- Fedecacao. (2021). *BOLETIN DE PRENSA - Gobierno invirtió más de \$11 mil millones para sustituir cultivos ilícitos por cacao.*
<http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-04-23-20-00-33/1409-gobierno-invirtio-mas-de-11-mil-millones-para-sustituir-cultivos-ilicitos-por-cacao>
- Fedecacao. (2020). *BOLETÍN DE PRENSA: Pese a las adversidades el 2019 dejó cifras positivas para el sector cacaotero.*
<http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-04-23-20-00-33/1103-boletin-de-prensa-pese-a-las-adversidades-el-2019-dejo-cifras-positivas-para-el-sector-cacaotero>
- Fedecacao. (2020). *BOLETÍN DE PRENSA - Así quedó el ranking de producción de cacao en Colombia.* <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-04-23-20-00-33/1193-boletin-de-prensa-asi-queda-el-ranking-de-produccion-de-cacao-en-colombia>
- FEDECACAO. (2019). *Un año muy productivo para el cacao colombiano.* 51, 20.
https://www.fedecacao.com.co/portal/images/Colombia_Cacaotera_-_NOVDIC_2019_-_20PAG_-FINAL_OKK_-baja_compressed.pdf%0A

- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(3), 626 LP – 631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Gamez, R., Cardinale, M., Montes, M., Ramirez, S., Schnell, S., & Rodriguez, F. (2019). Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). *Microbiological Research*, *220*, 12–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.006>
- Geetha, T., Nyamath, S., & Karthikeyan, S. (2021). *Chapter 17 - Recent developments in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture* (B. B. T.-R. D. in A. M. and B. Viswanath (ed.); pp. 181–192). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00017-5>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 793–796. <https://aem.asm.org/content/61/2/793>
- He, A., Niu, S., Yang, D., Ren, W., Zhao, L., Sun, Y., Meng, L., Zhao, Q., Paré, P. W., & Zhang, J. (2021). Two PGPR strains from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron* promoted growth and enhanced drought tolerance of ryegrass. *Plant Physiology and Biochemistry*, *161*, 74–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.003>
- Hipólito Romero, E., Carcaño Montiel, M. G., Ramos Prado, J. M., Vázquez Cabañas, E. A., López Reyes, L., & Ricaño Rodríguez, J. (2017). Effect of mixed edaphic bacterial inoculants in the early development of improved cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) in a traditional agroforestry system of Oaxaca, Mexico.

Revista Argentina de Microbiología, 49(4), 356–365.

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.003>

ICA. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de cacao*.

<https://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/->

ICCO. (2021). *Production of cocoa beans*. <https://www.icco.org/statistics/>

ILAC. (2019). CACAO FINO Y DE AROMA PARA AMÉRICA LATINA Cacao fino de aroma , un producto latinoamericano de exportación. *Banco de Desarrollo de América Latina*, 6, 1–15.

<https://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1452/Iniciativa>

Latinoamericana del Cacao Boletín No. 6.pdf?sequence=1%0A

Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. L. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(2), 256–275. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>

Leal, G. (2017). *Selección de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) con capacidad de promoción de crecimiento vegetal, provenientes de cultivos de caña panelera con manejos agronómicos contrastantes*.

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/63901/GloriaInesLealMedina.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Li, H., Qiu, Y., Yao, T., Ma, Y., Zhang, H., & Yang, X. (2020). Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil and Tillage Research*, 199, 104577.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104577>

- Mehta, P., Chauhan, A., Mahajan, R., Mahajan, P. K., & Shirkot, C. K. (2010). Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. *Current Science*, 98(4), 538–542. <http://www.jstor.org/stable/24111705>
- Minagricultura. (2020). Cadena de valor de Cacao. In *Dirección de cadenas agrícolas y forestales*. [https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31 Cifras Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf)
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1 SE-), 68–83.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Murcia, A., & Cruz, S. F. (2017). *Efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en Maracuyá y Badea cultivadas en condiciones de estrés hídrico*. (Issue 6).
<https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1013&context=biologia>
- Osorio, N. W. (2012). pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. *Manejo Integral Del Suelo y Nutrición Vegetal*, 1(4), 4–7.
[http://www.walterosorio.net/web/sites/default/files/documentos/pdf/1 4 pH del suelo y nutrientes_0.pdf](http://www.walterosorio.net/web/sites/default/files/documentos/pdf/1%204%20pH%20del%20suelo%20y%20nutrientes_0.pdf)
- Parnell, J. J., Berka, R., Young, H. A., Sturino, J. M., Kang, Y., Barnhart, D. M., & DiLeo, M. V. (2016). From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1110.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01110>

- Patel, J. S., Kumar, G., Bajpai, R., Teli, B., Rashid, M., & Sarma, B. K. (2021). Chapter 18 - PGPR formulations and application in the management of pulse crop health. In A. Rakshit, V. S. Meena, M. Parihar, H. B. Singh, & A. K. Singh (Eds.), *Biofertilizers* (pp. 239–251). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00012-9>
- Pereira, S. I. A., Abreu, D., Moreira, H., Vega, A., & Castro, P. M. L. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Heliyon*, *6*(10), e05106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05106>
- Posada, L. F., Ramírez, M., Ochoa-Gómez, N., Cuellar-Gaviria, T. Z., Argel-Roldan, L. E., Ramírez, C. A., & Villegas-Escobar, V. (2016). Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. *Scientia Horticulturae*, *212*, 81–90.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.040>
- Ramírez, C. A., & Kloepper, J. W. (2010). Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, *46*(8), 835–844. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0488-2>
- Ramirez, M. (2008). *RIZOBACTERIAS ASOCIADAS A CRISANTEMO (Dendrathera grandiflora. Tevelev) CON POTENCIAL PARA PROMOVER CRECIMIENTO VEGETAL*. Universidad de Antioquia.
- Restrepo, G., Maria, S., & Moreno, M. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, *46*(1), 63–76.
https://www.researchgate.net/publication/331048875_Bacterias_solubilizadoras_de

_fosfato_y_sus_potencialidades_de_uso_en_la_promocion_del_crecimiento_de_cultivos_de_importancia_economica

Rojas Solís, D., Hernández Pacheco, C. E., & Santoyo, G. (2016). Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 22, 45–58. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2016000100045&nrm=iso

Rojas, D., Hernandez, C., & Santoyo, G. (2016). Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 22, 45–58. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2016000100045&nrm=iso

Rosas, G., Puentes, Y. J., & Menjivar, J. C. (2017). Relación entre el pH y la disponibilidad de nutrientes para cacao en un entisol de la Amazonia colombiana. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3), 529–541. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num3_art:742

Ruiz Martinez, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* : aportacion al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. *Universidad de Barcelona, Tesis doct*, 7–9.

Sánchez, J. D. (2012). Acidez de los suelos y su manejo. *Cenibanano*, 3(March), 1–10. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18581.32486>

Sanmartín, P., Lopez, X., Pemberty, M., David Granada, & Rueda, A. (2012). Análisis del modo de acción de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Tumbaga*, 2(7), 3.

https://www.researchgate.net/publication/260390126_Analisis_del_modode_accion_y_de_la_capacidad_antagonica_de_Trichoderma_asperellum_sobre_Colletotrichum_gloeosporioides_y_Fusarium_sp

Singh, Y., Ramteke, P. W., & Shukla, P. K. (2013). Isolation and characterization of heavy metal Resistant *Pseudomonas* spp. and their plant growth promoting activities. *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research*, 4(1), 269–272. www.pelagiaresearchlibrary.com

Solanki, M. K., Robert, A. S., Singh, R. K., Kumar, S., Pandey, A. K., Srivastava, A. K., & Arora, D. K. (2012). Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Current Microbiology*, 65(3), 330–336. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0160-1>

Suzuki, S., He, Y., & Oyaizu, H. (2003). Indole-3-Acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Current Microbiology*, 47(2), 138–143. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3968-2>

Ugra. (2020). Ficha de inteligencia TABACO. *Finagro*, 1–14. https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/ficha_tabaco_version_ii.pdf

Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B., & Brözel, V. S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4970–4977. <https://doi.org/10.1128/AEM.03076-05>

Villamil Carvajal, J. E., Viteri Rosero, S. E., & Villegas Orozco, W. L. (2015). Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de

Moniliophthora royeri Cif & Par en Theobroma cacao L. Bajo Condiciones de Campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7441–7450. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47830>

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology; Vol. 36, Núm. 1 (2018)*. <https://www.smf.org.mx/rmf/ojs/index.php/RMF/article/view/100>

Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., & Jeger, M. J. (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101(9), 1024–1031. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-10-0216>

Zehnder, G. W., Yao, C., Murphy, J. F., Sikora, E. R., Kloepper, J. W., Schuster, D. J., & Polston, J. E. (1999). Microbe-Induced Resistance Against Pathogens and Herbivores: Evidence of Effectiveness in Agriculture. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture*, ., 335–355.