

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología – Microbiología

Evaluación de la actividad de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 como promotoras del crecimiento vegetal y del control biológico de hongos fitopatógenos y de maleza

TESIS

Presentada por:

Bach. YOLA GLADYS AGUILAR CATAORA

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2024

Acta de sustentación de Tesis N° 408

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Jorge Basadre Grohmann, siendo las 9:20 horas del día 26 de enero del 2024, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 10757-2024-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:

Dea. Soledad Bornás Acosta	Presidente
MSc. Liduvina Sulca Quispe	Secretaria
Dr. Daladier Castillo Cotrina	Vocal

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el presidente del Jurado instó a la Bachiller: Yola Gladys Aguilar Catacora, a exponer la tesis titulada: Evaluación de la actividad de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y de *Anaerobiospirillum succiniciproducentis* cepa TP22 como promotoras del crecimiento vegetal y del control biológico de hongos fitopatógenos y de maleza, para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo.

Siendo las 11:30 horas, la tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad, con el calificativo de Bueno nota 16, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 10:30 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



Dea. Soledad Bornás Acosta
Presidente



MSc. Liduvina Sulca Quispe
Secretaria



Dr. Daladier Castillo Cotrina
Vocal

Fe de erratas: Dice siendo las 10:30 horas; debe decir siendo las 10:00 horas

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina, en calidad de asesor acreditado por la RESOLUCIÓN DE FACULTAD N° 10215-2022-FAC1-UN/JBG, en relación con la tesis titulada "Evaluación de la actividad de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y de *Anaerobiospirillum succiniproducens* cepa TP22 como promotoras del crecimiento vegetal y del control biológico de hongos fitopatógenos y de maleza", presentada por la Bachiller Yola Gladys Aguilar Catacora, como parte de los requisitos para obtener el Título profesional de Biólogo Microbiólogo.

Después de haber seguido las pautas establecidas en el reglamento de originalidad y similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, y tras realizar una revisión exhaustiva utilizando el software de similitud textual TURNITIN, se ha determinado que el nivel de similitud es del 5%, dentro del rango permitido.

Por lo tanto, certifico que el grado de similitud de la tesis es conforme con los estándares permitidos, lo que permite continuar con los procedimientos necesarios para su publicación en el repositorio institucional.

Este certificado se emite con el propósito de facilitar la continuación de los trámites para la obtención del Título profesional.

Tacna, 24 de abril de 2024



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

Asesor

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, quienes siempre me han impulsado a dar lo mejor de mí, incluso en los momentos más difíciles, y a todas aquellas personas cercanas que me brindaron un apoyo inquebrantable a lo largo de este ciclo académico.

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna por la invaluable enseñanza proporcionada durante mi trayectoria como estudiante.

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Tarapacá, ubicada en Arica, Chile, por su generosa disposición al permitirme utilizar sus instalaciones y por facilitarme las condiciones necesarias durante la fase experimental.

Al Dr. Daladier Castillo Cotrina, mi asesor, por su apoyo, orientación, confianza y creer en mis capacidades como estudiante, por su disponibilidad durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Patricio Muñoz Torres, mi co asesor, por los conocimientos enseñados y aportados como mentor, por su gran disponibilidad durante todo este periodo de tesis, muy agradecida por integrarme durante este tiempo en el proyecto Fondecyt de iniciación N° 11200093.

A Steffany Cárdenas Ninasivincha por enseñarme sus propias técnicas y conocimientos, por su disponibilidad a responder las inquietudes.

A Antonio Quezada y Franco Bugeño por su disponibilidad para apoyar en el desarrollo del trabajo.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Hipótesis.....	4
1.3. Justificación.....	4
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos	6
1.5. Antecedentes	7
1.6. Marco teórico	10
1.6.1. Región de Arica y Parinacota y su agricultura.....	10
1.6.2. Bacterias extremófilas.....	12
1.6.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	13
1.6.4. Control biológico de hongos fitopatógenos	18
1.6.5. Control biológico de maleza	19

II.	MATERIAL Y MÉTODO	18
2.1.	Materiales.....	18
2.1.1.	Material biológico.....	18
2.1.2.	Reactivos.....	18
2.1.3.	Equipos	24
2.1.4.	Material de vidrio y otros.....	24
2.1.5.	Material de invernadero y fungibles	25
2.2.	Diseño de la investigación	26
2.3.	Población y muestra	29
2.3.1.	Población.....	29
2.3.2.	Muestra	29
2.4.	Métodos.....	29
2.4.1.	Reactivación de las bacterias	29
2.4.2.	Caracterización funcional	31
2.4.3.	Tolerancia de las bacterias a sal y boro	34
2.4.4.	Optimización de las condiciones de cultivo y determinación de la curva de crecimiento bacteriano óptimo.....	34
2.4.5.	Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> cepa TP22 en <i>Zea mays</i> L. (maíz “Luteño”).....	35
2.4.6.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> cepa TP22.....	36
2.4.7.	Evaluación de la capacidad biocontroladora de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> cepa TP22 contra <i>Fusarium oxysporum</i> de las plantas de <i>Zea mays</i>	37
2.4.8.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad biocontroladora de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> cepa TP22 contra la maleza <i>Cenchrus echinatus</i>	38
III.	RESULTADOS	40
3.1.	Reactivación de las bacterias	40
3.2.	Caracterización funcional de las bacterias	40
3.3.	Tolerancia de las bacterias a sal y boro.....	42
3.4.	Optimización de las condiciones de cultivo.....	43
3.5.	Determinación de la curva de crecimiento bacteriano en condiciones óptimas	44

3.6. Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22 en maíz “Lluteño”	47
3.7. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22	51
3.8. Evaluación de la capacidad biocontroladora de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22 contra <i>Fusarium oxysporum</i> de las plantas de <i>Zea mays</i>	52
3.9. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad biocontroladora de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y de <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22 contra la maleza <i>Cenchrus echinatus</i> (cadillo)	54
IV. DISCUSIÓN	56
V. CONCLUSIONES	62
VI. RECOMENDACIONES	63
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
VIII. ANEXOS	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Operacionalización de las variables.....	28
Tabla 2	Características microbiológicas de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22	41
Tabla 3	Caracterización funcional de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22.....	42
Tabla 4	Tolerancia a NaCl y H ₃ BO ₃ de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22	43
Tabla 5	Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de la <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22	45
Tabla 6	Efecto de aplicación de las bacterias <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 en plantas de maíz “Lluteño”	48
Tabla 7	Efecto de la aplicación de las bacterias <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22 en plantas de maíz “Lluteño”	49
Tabla 8	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de las bacterias <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22 contra hongos fitopatógenos. El error corresponde a la desviación estándar	52

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Curva de crecimiento óptimo de *P. aeruginosa* cepa J19 (A) y *A. succiniciproducens* cepa TP22 (B) peracionalización de las variables..... 46
- Figura 2** Capacidad bioestimulante de *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 en maíz “Lluteño” 50
- Figura 3** Media y desviación estándar de la altura de las plantas de maíz “Lluteño” tratadas en un periodo de 33 días (N=15 plantas por tratamiento..... 50
- Figura 4** Media y desviación estándar de número de hojas en plantas de maíz “Lluteño” tratadas en un periodo de 33 días (N=15 plantas por tratamiento) 51
- Figura 5** Efecto biocontroladora de *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 *F. oxysporum* en plantas de maíz variedad GSS3951 53
- Figura 6** Peso fresco de las plantas de maíz variedad GSS3951 expuesta *F. oxysporum* y tratadas con *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 53
- Figura 7** Efecto de las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 sobre el índice del porcentaje de germinación (IG) y longitud de la radícula de *C. echinatus* 55

RESUMEN

Las bacterias que habitan en ambientes extremos tienen la capacidad de sobrevivir a condiciones extremas para la vida del hombre y poseen propiedades de reducir el estrés biótico y abiótico en plantas, tienen un potencial agrícola, fundamental para promover el crecimiento de las plantas y controlar los fitopatógenos perjudiciales para la calidad de los cultivos. En este estudio, se evaluó la actividad de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 como promotores del crecimiento vegetal y del control biológico de hongos fitopatógenos y de maleza. Se utilizó métodos para determinar las características funcionales, la capacidad de biocontrol contra hongos fitopatógenos y maleza por las cepas J19 y TP22 *in vitro* y en condiciones de invernadero. Las cepas J19 y TP22 mostraron la capacidad de crecer en medio de cultivo suplementado con 8 g/L NaCl, y suplementado con NaCl y H₃BO₃ a concentraciones 1, 2, 4 y 8 veces superior al agua de riego de Lluta (0,86 g/L NaCl y 114 ppm de H₃BO₃). Ambas cepas poseen propiedades promotoras del crecimiento vegetal, la cepa J19 fija nitrógeno, solubiliza fósforo, produce auxinas, produce la enzima ACC desaminasa, produce enzimas líticas y ácido cianhídrico (HCN). La cepa TP22 fija nitrógeno, produce proteasas y quitinasas. Ambas bacterias promueven el crecimiento de la parte radicular de *Zea mays* L. tipo amylacea (maíz “Lluteño”), e inhiben *in vitro* el crecimiento radial de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Monilinia frutícola*, *Geotrichum candidum* y *Macrophomina phaseolina* en un porcentaje mayor al 50%, a excepción de la cepa TP22

que inhibe a *Fusarium oxysporum* y la cepa J19 a *Macrophomina phaseolina* en un porcentaje menor al 50%. El efecto de la cepa TP22 en el crecimiento de las plantas de maíz variedad GSS3951 en presencia de *Fusarium oxysporum* fue mayor que la cepa J19, Serenade® y el control. Las cepas J19 y TP22 mostraron un efecto fitotóxico contra *Cenchrus echinatus* (cadillo), inhibiendo la germinación en un 72% y 43%, respectivamente. Este estudio permitirá desarrollar alternativas biológicas efectivas en la agricultura de zonas áridas.

Palabras clave: *Pseudomonas*; *Anaerobiopirillum*; promotores de crecimiento vegetal; control biológico; *Fusarium oxysporum*; maleza

ABSTRACT

Bacteria that inhabit extreme environments have the ability to survive conditions extreme for human life and they have properties that help reduce biotic and abiotic stress in plants, they have agricultural potencial, essential to promote the plant growth and to control plant pathogens detrimental to crop quality. In this study, the activity *Pseudomonas aeruginosa* strain J19 and *Anaerobiospirillum succiniciproducens* strain TP22 was evaluated as promoters the plant growth and biological control of phytopathogenic fungi and weeds. Methods used to determine the functional characteristics, the biocontrol ability against phytopathogenic fungi and weeds by the strains J19 and TP22 *in vitro* and under greenhouse conditions. The strains J19 y TP22 showed the ability to grow in culture medium supplemented with 8 g/L NaCl and supplemented with NaCl and H3BO3 medium at concentrations 1, 2, 4 and 8 times greater than the Lluta irrigation water (0,86 g/L NaCl y 114 ppm de H3BO3). Both strains have plant growth promoting properties, the J19 strain fixes nitrogen, solubilize phosphorus, produce auxin, produce the enzyme ACC deaminase, produce lytic enzymes and hydrocyanic acid (HCN). The TP22 strain fixes nitrogen and produce proteases and chitinases. Both bacteria promote the growth of the root part of *Zea mays* L. var. *amylacea* (corn "Lluteño"), and inhibit *in vitro* the radial growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Monilinia frutícola*, *Geotrichum candidum* and *Macrophomina phaseolina* in a percentage higher than 50%, except for the TP22 strain that inhibits *Fusarium oxysporum* and the J19 strain inhibits *Macrophomina phaseolina*

in a percentage less than 50%. The effect of the TP22 strain on the growth of corn plants of variety GSS3951 in the presence of *Fusarium oxysporum* was greater than the J19 strain, Serenade® and the control. The strains J19 and TP22 were shown a phytotoxic effect against *Cenchrus echinatus* (cadillo), inhibiting germination by 72% and 43%, respectively. This study would allow the development of effective biological alternatives for agriculture in arid areas.

Keywords: *Pseudomonas*; *Anaerobipirillum*; plant growth promoting; biological control; *Fusarium oxysporum*; weeds

I. INTRODUCCIÓN

Las termas de Jurasi y las termas de Polloquere se ubican en la Cordillera de los Andes, en la región de Arica y Parinacota (Chile) y se caracterizan por ser sitios que poseen una alta radiación ultravioleta y temperaturas extremas, además, presentan un alto contenido de sales y minerales (Muñoz *et al.*, 2023). En estos sitios geotermales se encuentran microorganismos extremófilos y extremotolerantes de gran interés por su producción de metabolitos (Márquez *et al.*, 2022) que se consideran beneficiosos para la agricultura porque contribuyen a mitigar las condiciones de estrés biótico y abiótico en los cultivos hortícolas (Berg *et al.*, 2014). Las condiciones de estrés en los cultivos se deben al uso desmedido de productos agroquímicos y al inadecuado sistema de riego que pueden causar la infertilidad de suelos reduciendo su microbioma y la salinidad del suelo por acumulación de carbonatos, cloruros, sulfatos, entre otros, siendo la salinidad un problema frecuente en ambientes áridos y semiáridos. Además, el uso excesivo de agroquímicos ha permitido la aparición de resistencias por parte de diferentes plagas a estos agroquímicos (Becquer, 2022; Mandal *et al.*, 2020; Muñoz, 2018; Villegas *et al.*, 2018). Ante estos problemas se buscan productos biológicos que puedan ser funcionalmente efectivos en los cultivos de ambientes áridos y semiáridos. Estos productos biológicos permiten lograr una mayor productividad y una agricultura sustentable, ya que estas bacterias son capaces de promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de metabolitos, incluyendo la producción de fitohormonas, fijar nitrógeno elemental y solubilizar

fósforo; y a través de la producción de enzimas líticas que controlan organismos patógenos perjudiciales en la agricultura, además de tolerar las condiciones salinas (Benjumeda, 2017; Moreno *et al.*, 2018).

1.1. Planteamiento del problema

La región de Arica y Parinacota se caracteriza por ser una región de ambiente extremo, con suelos pobres en componentes orgánicos y escasos recursos hídricos, los cuales están influenciados por la actividad geotérmica de la Cordillera de los Andes. Este fenómeno hace que los suelos y las aguas de los valles de Lluta y Azapa, usados para la actividad agrícola, presenten altas concentraciones de salinidad, boro y arsénico. Además, estos suelos reciben altos niveles de radiación ultravioleta, calor y baja humedad atmosférica (Cornejo, 2009). Por lo tanto, las bacterias que habitan en los diferentes ambientes de esta región pueden ser consideradas extremófilas y extremotolerantes, pudiendo algunas presentar un alto potencial para su aplicación en actividades agrícolas para la Región Arica y Parinacota, Chile. El uso de tecnologías basadas en microorganismos benéficos provenientes de esta región es limitado, y se debe considerar que los productos comerciales actualmente muestran resultados erráticos en zonas desérticas. Este último fenómeno se debe; a que los microorganismos de productos comerciales fueron aislados desde sitios con condiciones edafoclimáticas disímiles a la de la región y por ende no están adaptados a este tipo de ambiente. Esto hace necesario la búsqueda de microorganismos endémicos de sitios con características ambientales similares a las de su aplicación, en este contexto, bioprospectando bacterias a partir de sitios geotermales con altas concentraciones de NaCl y boro se planteó el estudio y uso de estos

microorganismos como potenciales para el desarrollo de productos biológicos funcionales aplicables a condiciones áridas y semiáridas que tienen condiciones ambientales similares al lugar de origen de las bacterias estudiadas en este trabajo.

En los sitios geotermales de la región Arica y Parinacota, se encuentran microorganismos extremófilos y extremotolerantes, como es el caso de miembros de los géneros *Pseudomonas* y *Anaerobiospirillum*. Estos microorganismos fueron aislados de estos ambientes y evaluados para su aplicación como promotores del crecimiento vegetal y del control biológico de hongos fitopatógenos y maleza.

Tanto la acción promotora del crecimiento vegetal, como la actividad controladora de hongos fitopatógenos y de maleza es llevada a cabo por diversos metabolitos que los microorganismos del género *Pseudomonas* producen extracelularmente, a nivel de la rizosfera en las plantas. Estos microorganismos de los géneros *Pseudomonas* y *Anaerobiospirillum*, poseen un potencial para la actividad del crecimiento vegetal que los convierten en excelentes candidatos para el desarrollo de un nuevo bioproducto para su comercialización y aplicación a nivel de los campos de cultivos vegetales en zonas áridas y semiáridas.

En el presente proyecto se planteó como problema de investigación: ¿Presentarán las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 un alto potencial como promotora del crecimiento vegetal y del control biológico de hongos fitopatógenos y de maleza *in vitro* y condiciones de invernadero?

1.2. Hipótesis

Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 tienen un alto potencial de promover el crecimiento vegetal y la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y de maleza.

1.3. Justificación

En los últimos años, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) han generado un gran interés en la agricultura sostenible, puesto que estas bacterias tienen capacidad de producir metabolitos que promueven el rendimiento y producción de los cultivos vegetales (Vejan *et al.*, 2016). Dentro de este contexto, se han reportado bacterias miembros de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, entre otros, como promotoras del crecimiento vegetal (Moreno *et al.*, 2018).

Por una parte, las bacterias del género *Pseudomonas* son de interés para la industria agrícola debido a que promueven el crecimiento de plantas e inhiben el desarrollo de patógenos perjudiciales como hongos, insectos y maleza (Cesa *et al.*, 2020). Además, actúan como agentes de biorremediación, biopolímeros y en la fabricación de bioplásticos (Weimer *et al.*, 2020). Por otra parte, el género *Anaerobiospirillum* es de interés por su producción de ácidos orgánicos utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica, industria de pesticidas y agrícola, siendo este último de menor uso del género *Anaerobiospirillum* por su exiguo estudio en la agricultura (Avila, 2019; Chialva & Griffa, 2020).

El estudio de estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal permitirá que el grupo de investigación en Laboratorio de Patología Vegetal y Bioproductos de la Universidad de Tarapacá continúe estudiando la formulación de las bacterias seleccionadas y su evaluación en campo de cultivos vegetales en condiciones salino-bóricas, a partir de los datos obtenidos. Además, estas bacterias se podrían extrapolar a volúmenes mayores en biorreactores como una alternativa agroindustrial amigable con el medio ambiente.

1.4. Objetivos

1.4.1. *Objetivo general*

Evaluar la actividad de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 como promotores del crecimiento vegetal y del control biológico de hongos fitopatógenos y de maleza *in vitro* y condiciones de invernadero.

1.4.2. *Objetivos específicos*

- Evaluar la actividad promotora del crecimiento vegetal de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 en condiciones de invernadero.
- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 contra hongos fitopatógenos.
- Evaluar la capacidad de biocontrol de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 contra *Fusarium oxysporum* en plantas de maíz variedad GSS3951 Syngenta en condiciones de invernadero.
- Determinar la actividad antagónica *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 contra la maleza *Cenchrus echinatus* (cadillo).

1.5. Antecedentes

En Chile, Muñoz *et al.* (2021) describió la bacteria endofítica de raíces de plantas de orégano *Pseudomonas* sp. cepa S57 para la promoción del crecimiento vegetal y biocontrol de hongos fitopatógenos en Arica, Chile. Los autores determinaron que la cepa S57 posee una similitud con *Pseudomonas lini*, y tiene la capacidad de tolerar 8 g/L y 15 g/L de NaCl, y de 10 a 100 ppm de H₃BO₃. Por otra parte, *Pseudomonas* sp. cepa S57 posee actividades promotoras del crecimiento vegetal (PGP), ya que fija nitrógeno, solubilizó fosfato, produce 7,9 µg/mL de ácido indol-3-acético (IAA) y produce 24.2 psu de sideróforos. Las plantas de tomate var. Micro-Tom tratadas con la bacteria S57 (1 x 10⁸ UFC) mostraron un aumento de 2,27 veces en el peso húmedo de la parte aérea (5,35 ± 1,00) y 1,33 veces en la longitud del tallo (15,7 ± 1,10), comparados a las plantas no inoculadas con la bacteria. En referencia al control biológico de hongos fitopatógenos, la cepa S57 inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 23,5%. En tanto, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum* y *Monilinia fructicola* mostró un porcentaje mayor al 50%. Además, las condiciones óptimas de la cepa S57 fueron 150 rpm de agitación, 35 °C y pH 5,5.

En Chile, Reyes *et al.* (2019) describieron a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) que promueven el crecimiento de *Solanum lycopersicum* L. (tomate), y mejoran la disponibilidad de nitrógeno y fósforo. En este estudio, se determinaron que la cepa Tmt-16 posee una similitud con *Pseudomonas gessardii* (99,97%) y la cepa Hb-142 posee una similitud con *Pseudomonas marginalis* (100%). La aplicación de cepa Tmt-16 en tomate mostró un efecto positivo en el crecimiento de la raíz de la planta de

tomate en un 23,57% con respecto al control. Sin embargo, mostró un efecto menor en la altura de la planta. La bacteria *Pseudomonas gessardii* cepa Tmt-16 aplicada en tomate, aumentó significativamente el contenido de nitrógeno en el tejido vegetal en un 2,60% en comparación al control, lo que indicaría un potencial biofertilizante o bioestimulante. El uso de *Pseudomonas marginalis* cepa Hb-142 mostró una disminución de fósforo disponible en el tejido vegetal, de entre 0,13% y 0,14%, en plantas de tomate. La eficacia de la solubilización de fósforo depende de la capacidad de las bacterias para colonizar la rizosfera y mantener su actividad biológica.

En India, Roychowdhury *et al.* (2019) realizaron el aislamiento y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PGP para evaluar la promoción del crecimiento vegetal de *Brassica juncea*. La bacteria resultó positiva para la producción de ácido cítrico y solubilización de fosfato de $4,1 \pm 0,1$; fijación de nitrógeno entre $3,057 \pm 0,34$ a $7,87 \pm 0,34$ mg L⁻¹, producción de sideróforos en 40% y producción de auxina (IAA) en 78 µg/mL, además, de la producción de HCN de 256 mM y producción de amonio de $0,380$ µg mL⁻¹. Las semillas de *Brassica juncea* fueron inoculadas y no inoculadas con la bacteria, las cuales germinaron en su totalidad, sin mostrar diferencia. Las plantas inoculadas con la bacteria mostraron un aumento en la longitud de la raíz (6,25 cm), longitud del brote (4,9 cm) y peso húmedo 28% en comparación al control. Las semillas inoculadas presentaron mayor colonización bacteriana y promoción del crecimiento vegetal en comparación a las inoculadas en la rizosfera.

En Pakistán, Uzair *et al.* (2018) realizaron el aislamiento y caracterización *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PS24 con actividad

promotora del crecimiento vegetal. En este estudio, determinaron que la cepa PS24 tiene un potencial PGP, ya que tiene la capacidad de producir sideróforos, producción de ácido indol-3-acético (IAA), solubilizar fósforo y producción de ácido cianhídrico (HCN). De forma adicional, la cepa PS24 inhibe el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum*.

En México, Pacheco *et al.* (2015) estudió el efecto fitotóxico de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical de *Axonopus affinis* (grama brasileña) y *Lens esculenta* Moench (lenteja), lo cual consistió en caracterizar la producción de ácido cianhídrico (HCN) de *Pseudomonas* sp. A52, que es responsable inhibir el crecimiento de plantas y el efecto inhibitorio en plántulas *Axonopus affinis* y *Lens esculenta* Moench. Además, determinaron la elongación radicular de las plántulas de *Axonopus affinis*, mostrando como resultado una disminución en promedio del 75% del crecimiento. Sin embargo, las plántulas de *Lens esculenta* Moench mostraron una disminución del crecimiento en promedio del 50% en comparación al control.

En China, Yang *et al.*, (2014) estudiaron la actividad herbicida de *Pseudomonas aeruginosa* CB-4 contra *Digitaria sanguinalis* mostrando un alto potencial herbicida, el cual se basó en la inhibición del crecimiento de la maleza. Además, inhibió la germinación de las semillas de *Pennisetum purpureum*, *Oryza sativa*, *Pisum sativa* y *Amaranto espinoso* debido a la presencia de quinolina y la exposición a niveles altos de HCN. De acuerdo con Diaz *et al.* (2005), el efecto bioherbicida de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS en maleza mostró mayor efectividad, inhibición germinativa en semillas

de malezas dicotiledóneas, malezas invasivas y muy poca en monocotiledóneas. Además, las semillas que llegaron a germinar presentaron un crecimiento atrofiado.

El estudio biotecnológico de *A. succiniciproducens* es exiguo, algunos trabajos mencionan a la bacteria como productora de ácidos orgánicos que estimulan el crecimiento de las plantas. La bacteria *Anaerobiospirillum succiniciproducens* produce altas concentraciones de ácido succínico y bajas concentraciones de etanol, ácido acético y ácido málico, en condiciones anaeróbicas (Avila, 2019). El ácido orgánico producido por la bacteria, se emplean en la industria agrícola, farmacéutica y en la industria de los alimentos (Chialva & Griffa, 2020).

1.6. Marco teórico

1.6.1. Región de Arica y Parinacota y su agricultura

La región de Arica y Parinacota (Chile) se ubica en el extremo norte del desierto de Atacama, y se caracteriza por ser una zona árida de ambiente extremo, desde una perspectiva antropogénica, debido a factores ambientales tales como la radiación solar, temperaturas extremas, humedad atmosférica y la escasez de agua con precipitación anual menor a los 3 mm/año, la cual es originada en la Cordillera de los Andes. La escasez de agua está relacionada con la escasa humedad del suelo, la capacidad de absorber el agua y evapotranspiración de las plantas. Sin embargo, la disponibilidad de agua en la región de Arica y Parinacota está relacionada con la actividad hidrotermal aportando NaCl, boro y arsénico que luego son distribuidas en cuencas

hidrográficas (Cornejo, 2009). El agua dispuesta en los ríos de los valles de Azapa y Lluta es utilizada por los agricultores en el cultivo de tomate, maíz, cebolla, zapallo italiano, plantas forrajeras, orégano, entre otros, siendo el tomate el producto más destacado (ODEPA, 2020). El valle de mayor explotación agrícola es el valle de Azapa con un 52%, debido a la disponibilidad de agua (caudal promedió $0,705 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) y suelos de una estratificación marcada. Además, los suelos son calcáreos, moderadamente alcalino, con una saturación de bases y porosidad adecuados para la agricultura (Aguilar *et al.*, 2015).

Además, la actividad hidrotermal es característica de los sistemas geotermales, la cual se manifiesta en fumarolas, géiseres, fuentes termales, entre otros (Lagos, 2016; Lahsen, 1976). La mayoría de los géiseres y fuentes termales se encuentran en la Cordillera de los Andes (Trujillo, 1974), siendo las termas de Jurasi y Polloquere de interés para el presente estudio.

Las fuentes termales son uno de los sistemas geotermales de mayor interés dado que poseen microbiota extremófila que se caracteriza por sus genes y metabolitos. Estos microorganismos extremófilos adquieren carbono y nitrógeno mediante simbiosis con otros organismos (Márquez *et al.*, 2022; Mehta & Satyanarayana, 2013). Además, la variabilidad ambiental de su hábitat permite el desarrollo de microorganismos extremotolerantes. Por lo tanto, el estudio de fuentes geotermales como las termas de Jurasi y Polloquere son de interés biotecnológico por sus condiciones ambientales extremas y su biodiversidad. Las termas de Jurasi están ubicadas en la Cordillera

de los Andes, al oeste de Putre a 4.100 msnm con agua termal que varía de 32 °C a 65 °C y un pH neutro, con un alto contenido de boro, metales y sales. Por otro lado, Las termas de Polloquere están ubicadas dentro del Monumento Natural Salar de Surire, al sureste del salar a 4.300 msnm con agua termal de hasta 75 °C y un pH de 6,8 con un alto contenido de sales y minerales que lo rodean (Muñoz *et al.*, 2023).

1.6.2. Bacterias extremófilas

Los extremófilos son un grupo de organismos que sobreviven en condiciones extremas para el ser humano, de los cuales solo han sido identificados menos del 1% y los organismos secuenciados por sus propiedades benéficas son aún menos (Babu *et al.*, 2015). Los extremófilos pueden ser categorizados de acuerdo con la temperatura, radiación, presión, salinidad, pH, tensión de oxígeno, entre otros parámetros (Durvasula & Subba, 2018). Debido a las condiciones físicas y químicas donde habitan, los extremófilos han adaptado sus genes y proteínas para sobrevivir bajo estos hábitats y producen osmolitos los cuales mantienen su homeostasis y corresponden a osmolitos orgánicos que protegen a las moléculas biológicas y células del daño causado por el estrés externo (Babu *et al.*, 2015; Lentzen & Schwarz, 2006). Los osmolitos orgánicos se componen de carbohidratos, aminoácidos y derivados de polioles (Raddadi *et al.*, 2015).

En relación a microorganismos extremotolerantes, se han descrito diversos filos bacterianos y fúngicos que son tolerantes a la

salinidad y la temperatura, tales como los filos Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Cianobacteria, Deinococcus, entre otros (Gaete *et al.*, 2022). El mayor origen de los productos naturales ha sido a partir de microorganismos bacterianos con un 78%, de los cuales destacan las bacterias de los géneros *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Actinomicetes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Acidithiobacillus*, *Halomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Geobacillus*, entre otros. Estas bacterias han sido de mayor reporte por su producción de metabolitos que son utilizados para diversas aplicaciones biotecnológicas. Dentro de los microorganismos fúngicos se encuentran el filo Ascomycota con un 22% que desarrolla bioproductos (Ramírez *et al.*, 2006; Velásquez *et al.*, 2018). Estos microorganismos extremotolerantes son utilizados en la agricultura para promover el crecimiento de plantas, rendimiento y calidad de los cultivos hortícolas en presencia de estrés salino e hídrico. Además, estos microorganismos realizan una función importante en la fertilidad del suelo y la sostenibilidad agrícola, reduciendo el uso de agroquímicos (Durvasula & Subba, 2018; Muñoz *et al.*, 2023; Shilev, 2020).

1.6.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen la capacidad de colonizar la planta para un mejor crecimiento, rendimiento vegetal y calidad del cultivo (Moreno *et al.*, 2018). Las plantas proporcionan carbono reducido y otros metabolitos a las bacterias, a la vez que estas secretan moléculas extracelulares que estimulan el crecimiento de las plantas, tales como fitohormonas,

enzimas, fijación de nitrógeno, entre otros procesos (Backer *et al.*, 2018). Dentro de este grupo de bacterias PGP se encuentran los géneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, entre otros (Glick, 1995; Maier *et al.*, 2004).

Los mecanismos de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son directos e indirectos. El mecanismo directo consiste en proporcionar a las plantas compuestos nutritivos a partir de la síntesis de metabolitos. Sin embargo, los mecanismos indirectos se caracterizan por ser antagónicos, dado que los metabolitos producidos por la bacteria causan la inhibición del crecimiento de microorganismos perjudiciales para la planta, además de estimular las defensas innatas de las plantas (Glick, 1995; Moreno *et al.*, 2018).

La fijación de nitrógeno es un mecanismo directo de promoción del crecimiento vegetal. Este fenómeno ocurre mediante complejos enzimáticos de nitrogenasa bacteriana, la cual transforma el nitrógeno atmosférico en amoníaco mediante las proteínas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. En este proceso de transformación de nitrógeno a amoníaco requiere también de la transferencia de energía de adenosín trifosfato (ATP) y el poder reductor unido a la cadena de transporte electrónico (Moreno *et al.*, 2018).

Otro mecanismo directo importante en el crecimiento de las plantas es la solubilización de fosfatos inorgánicos. Estos microorganismos permiten que los fosfatos insolubles presentes en

suelo puedan ser asimilados por las plantas (Moreno *et al.*, 2018). Dentro de los mecanismos que utilizan las bacterias para solubilizar fósforo se incluye la secreción de ácidos como el ácido butírico, succínico, málico, glucónico, acético, láctico y otros ácidos, que son producidos en el metabolismo de azúcares provenientes de los exudados de las raíces de las plantas. Además, en suelos con déficit de fósforo, las bacterias permiten la obtención de fósforo mediante la enzima fosfatasa que es capaz de solubilizar fósforo por hidrólisis de fósforo orgánico (Benjumeda, 2017).

Otro de los mecanismos directos es la producción de sideróforos por los microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Este mecanismo consiste en la solubilización del hierro y su incorporación al metabolismo celular. El proceso bioquímico consiste en el transporte y liberación del hierro dentro de la célula, a través de reacciones de óxido-reducción (Camelo *et al.*, 2011). El complejo sideróforo-Fe (III) es transportado a través de la membrana externa con ayuda de proteínas receptoras. En el periplasma, las proteínas receptoras liberan sideróforo-Fe (III) a compuestos que solo transportan hierro a través de la membrana citoplasmática e ingresa como Fe (II) por proteínas esterasas con gasto de ATP, en tanto el sideróforo es excretado al medio. El Fe (II) se extiende a través de la membrana por otras proteínas transportadoras para incorporarse finalmente a las vías metabólicas (Canavarro *et al.*, 2002).

Además de los mecanismos directos mencionados anteriormente, se encuentra la síntesis de fitohormonas que

desempeñan un papel importante como estimulante del crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como auxinas, giberelinas, citocininas y ácido abscísico. La auxina es una de las fitohormonas más reportadas debido a su efecto en la formación de dominios apicales, diferenciación vascular y el desarrollo de órganos. Dentro de las bacterias productoras de auxina se encuentran los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre otros. La síntesis de auxinas en bacterias está relacionada con tres vías metabólicas que tienen como precursor al triptófano. La primera vía es la del ácido indol-3-pirúvico presente en la mayoría de los microorganismos, la segunda vía metabólica es la formación de triptamina a partir de la conversión de triptófano en indol-3-acético aldehído y como última vía metabólica se encuentra la vía indol-3-acetamida presente en bacterias fitopatógenas (Camelo *et al.*, 2011; Tsavkelova *et al.*, 2006).

Otra de las fitohormonas producida por bacterias epífitas y rizosféricas son las giberelinas, las cuales aumentan el crecimiento de los tallos y detienen el estado de latencia de las semillas (Tsavkelova *et al.*, 2006). Estas hormonas son sintetizadas por tres enzimas, denominadas terpeno ciclasa, citocromo P450 monooxigenasa y la dioxigenasa. Otra de las fitohormonas de menor estudio en microorganismos bacterianos (rizobacterias) son las citocininas que derivan de los aminos purinas (zeatina), capaces de regular los procesos de la división de las células vegetales (Camelo *et al.*, 2011).

Otro de los mecanismos directos se encuentra la actividad de la enzima ACC desaminasa, la cual es importante para mitigar las

concentraciones de etileno y aumentar la disponibilidad de amonio como una fuente de nitrógeno para mejorar la nutrición de las plantas e incrementar su proliferación en las raíces (Esquivel *et al.*, 2013). La disminución de los niveles altos de etileno consiste en disminuir el contenido de etileno 1-aminociclopropano-1- carboxilato (ACC) en las plantas. La disminución de niveles de etileno se realiza a partir de la acción enzima ACC sintasa que transforma S-adenosil-L-metionina a ACC. El ACC puede ser exudado por la planta y absorbido por la bacteria e hidrolizado por la enzima ACC desaminasa a amonio como fuente de nitrógeno y alfa-cetobutirato como fuente de carbono (Glick *et al.*, 1998).

Por otra parte, entre los mecanismos indirectos es la producción enzimas líticas, las cuales reducen los efectos perjudiciales de fitopatógenos en el crecimiento y desarrollo de la planta. La reducción de fitopatógenos implica la síntesis de enzimas líticas como son las quitinasas, celulasas, proteasas, lipasas y 1,3-glucanasas, las cuales pueden lisar la pared celular de hongos fitopatógenos (Benjumeda, 2017; Vejan *et al.*, 2016). Además, tiene la capacidad de degradar la materia orgánica de origen vegetal o animal. Esta materia orgánica se utiliza para la nutrición de la planta (Osorio, 2009).

Otro mecanismo indirecto es la producción de ácido cianhídrico (HCN) que tiene la capacidad de suprimir el crecimiento de malezas (Kundan *et al.*, 2015). El HCN es un compuesto volátil producido por bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, el HCN es conocido por alterar la cadena respiratoria (Karimi *et al.*, 2012).

1.6.4. Control biológico de hongos fitopatógenos

El control biológico consiste en la evaluación de agentes o metabolitos biológicos antagónicos que suprimen una población de patógenos (Tangarife, 2021). Además, los agentes biocontroladores bacterianos son capaces de inducir las defensas innatas de las plantas para la disminución o inhibición de microorganismos fitopatógenos presentes en la planta, mediante la producción de elementos antimicrobianos, producción de enzimas líticas y producción de sideróforos que secuestran el hierro de los suelos limitando el crecimiento y presencia de microorganismos fitopatógenos. (Moreno *et al.*, 2018).

Un agente biocontrolador bacteriano más relevante es *Bacillus subtilis*, el cual se presenta como producto comercial Serenade®. Esta bacteria controla hongos patógenos del suelo o enfermedades foliares, tales como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Cercospora* spp., *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., *Oídium* spp., entre otros (Tangarife, 2021). Otro agente de control biológico es *Pseudomonas* sp. que inhibe el desarrollo de hongos fitopatógenos en condiciones limitantes de hierro, incluyendo hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phytophthora cinnmomi*, entre otros. El mecanismo de acción de bacterias del género *Pseudomonas* ocurre mediante la producción de antibióticos como la pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, piocianina, ácido fenacin-1-carboxílico, además, de la producción de compuestos orgánicos volátiles, producción de sideróforos y bacteriocinas. La

síntesis de estos metabolitos secundarios suprime el crecimiento de patógenos de raíz, limitando el hierro disponible para el patógeno (Santoyo *et al.*, 2010).

1.6.5. Control biológico de maleza

En la agricultura, las malezas son aquellas plantas que perjudican el desarrollo y rendimiento del cultivo, obteniendo los nutrientes, luz y humedad del suelo que podrían ser para el cultivo. Además, las prácticas agrícolas de control de las malezas demandan atención permanente para el agricultor y son menos eficientes (Martinez, 1990).

El control biológico es un método importante para las necesidades de la agricultura y el manejo de maleza. Este método se refiere a la aplicación de bioherbicida para el control de maleza de forma inmediata (Harding & Raizada, 2015). El uso de microorganismos controladores de maleza son eficientes, económicos y amigables con el ambiente (Norambuena, 1995). Además, el uso de estos microorganismos biocontroladores indica una disminución de la población de maleza, reduce los riesgos de resistencia a los herbicidas y poseen baja toxicidad (Bailey, 2014). Los microorganismos comúnmente utilizados son hongos, bacterias y virus. Dentro de los géneros fúngicos se encuentran representantes de los géneros *Phoma* y *Sclerotinia*, y dentro de las bacterias están miembros de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. En cambio, el uso de virus como control

de maleza puede ser inapropiado debido a la variabilidad genética y falta de especificidad del huésped (Harding & Raizada, 2015).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como las bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* son eficaces para el control biológico de maleza, estas bacterias producen metabolitos secundarios como el ácido cianhídrico (HCN) que inhibe la cadena de transporte de electrones y el suministro de energía a la célula causando muerte celular (Kundan *et al.*, 2015).

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Materiales

2.1.1. *Material biológico*

Se emplearon dos cepas bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22, las cuales son parte de la colección de bacterias del proyecto Fondecyt de Iniciación N° 11200093 del Laboratorio de Patología Vegetal y Bioproductos, de la Universidad de Tarapacá, Arica, Chile. Los hongos fitopatógenos empleados fueron *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum*, *Macrophomina phaseolina* y *Monilinia fructicola*, las cuales son parte de la colección de fitopatógenos del mismo laboratorio. La maleza empleada fue *Cenchrus echinatus*. Otros materiales empleados como hospedante fueron *Zea mays* L. (maíz Lluteño) y *Zea mays* variedad GSS3951.

2.1.2. *Reactivos*

- Ácido bórico (H_3BO_3)
- Ácido perclórico ($HClO_4$)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido etilendiaminotetraacético de hierro, Fe EDTA
- Ácido pícrico ($C_6H_2OH(NO_2)_3$)

- Agar carboximetilcelulosa (CMC)
- Agar - Agar
- Agar papa dextrosa (PDA)
- Azul de bromotimol
- Azul de tripano
- Biotina
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Chrome Azurol S (CAS)
- Cloruro de calcio (CaCl_2)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de cobalto (CoCl_2)
- Cloruro de hierro (FeCl_3)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Etanol 96°
- Extracto de levadura
- Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)
- Fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- Fuente de carbono (L-Asparagina, D-Glucosa, D-Galactosa, D-Celobiosa, D-Melibiosa, D-Fructosa, D-Ramnosa, D-Rafinosa, D-Manitol, D-Sorbitol, D-Inositol, Lactosa, Sacarosa)
- Gel de agarosa
- Glicerol
- Glicina
- Hidrolizado de caseína

- Hidróxido de potasio (KOH)
- Hipoclorito de sodio 5%
- Kit central Taq PCR (QIAGEN)
- Kit microbiano DNAeasy UltraClean (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA)
- Leche descremada
- Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Peptona
- Peptona de caseína, Triptona
- Pyridoxal HCl
- Quitina
- Reactivos de CTAB-PVP-Sílica
- Reactivos para tinción Gram (Cristal violeta, Lugol, Etanol y Safranina)
- Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de hierro (FeSO_4)
- Sulfato de magnesio (MgSO_4)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Tampón TAE
- Tween 80
- Urea

2.1.3. Equipos

- Autoclave
- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Centrifuga
- Contador de colonias manual
- Equipo multiparámetro
- Espectrofotómetro
- Estufa
- Incubadora de laboratorio con agitador
- Microscopio óptico
- Microscopio estereoscopio trinocular
- Refrigerador
- Set de micropipetas
- Sistema de electroforesis
- Termoblock
- Termociclador
- Vortex

2.1.4. Material de vidrio y otros

- Cámara de Howard
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro
- Espátula de Drigalski
- Frascos de vidrio de 500 mL y 1000 mL

- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Matraces de Erlenmeyer de 250 mL y 500 mL
- Placas de Petri
- Probeta de 250 mL
- Tubos de ensayo de 5 mL
- Vaso precipitado de 1 L, 500 mL y 200 mL
- Algodón hidrofóbico
- Asa de Kolle
- Barra agitadora magnética
- Gradilla para tubos de 15 mL y 50 mL
- Guantes de nitrilo de Talla S
- Jeringa de 1 mL y 10 mL
- Papel aluminio y Papel filtro
- Parafilm "M"
- Pizeta
- Puntas amarillas para micropipeta de 2 a 200 μ L
- Puntas azules para micropipeta de 100 a 1000 μ L
- Sacabocado de metal
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL y 0,5 mL
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL

2.1.5. Material de invernadero y fungibles

- Macetero de plástico de 5 L y 11 L
- Turba fardo 300 L y vermiculita saco 100 L
- Marcadores permanentes y cuaderno universitario de 100 hojas

2.2. Diseño de la investigación

Se desarrolló una investigación experimental para llevar a cabo los objetivos específicos planteados. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando Microsoft Excel 2016.

2.2.1. *Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de P. aeruginosa cepa J19 y de A. succiniciproducens cepa TP22*

En esta evaluación se empleó el diseño completamente aleatorizado, que tuvo 4 tratamientos: T1 (Cepa J19), T2 (Cepa TP22), T3 (Producto comercial BacNorte) y T4 (Control), con 15 repeticiones en cada tratamiento. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y se aplicó la prueba de Tukey $p < 0,05$ para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos.

2.2.2. *Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de P. aeruginosa cepa J19 y de A. succiniciproducens cepa TP22*

Se empleó el diseño completamente aleatorizado, que tuvo 15 tratamientos: T1 (*F. oxysporum*/ cepa J19), T2 (*F. oxysporum*/ cepa TP22), T3 (*F. oxysporum*), T4 (*B. cinerea*/ cepa J19), T5 (*B. cinerea*/ cepa TP22), T6 (*B. cinerea*), T7 (*G. candidum*/ cepa J19), T8 (*G. candidum*/ cepa TP22), T9 (*G. candidum*), T10 (*M. phaseolina*/ cepa J19), T11 (*M. phaseolina*/ cepa TP22), T12 (*M. phaseolina*), T13 (*M. fructicola* / cepa J19), T14 (*M. fructicola* / cepa TP22), T15 (*M. fructicola*) con 3 repeticiones en cada tratamiento.

2.2.3. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 contra *Fusarium oxysporum* de las plantas de *Zea mays*

El diseño utilizado fue el completamente aleatorizado, que tuvo 4 tratamientos: T1 (Cepa J19), T2 (Cepa TP22), T3 (Producto comercial Serenade®) y T4 (Control), con tres repeticiones en cada tratamiento. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y se aplicó la prueba de Tukey $p < 0,05$ para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos.

2.2.4. Evaluación *in vitro* de la actividad biocontroladora de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 contra la maleza *Cenchrus echinatus*

Se utilizó el diseño completamente aleatorizado, que tuvo 3 tratamientos: T1 (Cepa J19), T2 (Cepa TP22) y T3 (Control). En cada tratamiento se utilizaron 60 semillas de *Cenchrus echinatus*. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y se aplicó la prueba de Tukey $p < 0,05$ para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Tabla 1

Operacionalización de las variables

	Variable	Definición	Indicadores
Independiente	1 x 10 ⁶ UFC de <i>P. aeruginosa</i> cepa J19 y 1 x 10 ⁶ UFC de <i>A. succiniciproducens</i> cepa TP22	Bacterias aisladas de las Termas de Jurasi y Polloquere	Caracterización e identificación de la bacteria mediante amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S
Dependiente	Capacidad promotora del crecimiento vegetal.		Producción de auxinas, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, producción de quitinasas, producción de proteasas, producción de lipasas, producción de celulasas producción de sideróforos, producción de la enzima ACC desaminasa, producción de HCN y tolerancia de las bacterias a sal y boro. Medición de la altura de planta. Cuantificación de hojas. Producción de biomasa en peso fresco y seco del follaje y raíz.
	Capacidad de biocontrol contra hongos fitopatógenos		Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> y <i>Monilinia fruticola</i> . Control de <i>Fusarium oxysporum</i> en maíz variedad GSS3951 Syngenta.
	Capacidad de biocontrol contra maleza		Índice germinativo residual de <i>Cenchrus echinatus</i> . Elongación radicular residual de <i>Cenchrus echinatus</i> .

2.3. Población y muestra

2.3.1. Población

La población estuvo compuesta de 45 cepas bacterianas que pertenecen a la Colección de Cultivos Microbianos del Laboratorio de Patología Vegetal y Bioproductos de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Tarapacá (Anexo 1), procedentes de las Termas de Jurasi (S 18° 12' 36.0'', O 69° 30' 35.5'') y Polloquere (S 18° 54' 48'', O 68° 59' 55''), Región de Arica y Parinacota, Chile.

2.3.2. Muestra

Estuvo constituida por las cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 seleccionadas, de la colección microbiana, en base a que tenían como registro de características tolerancia a condiciones salino – bóricas y la producción de metabolitos que estimulan el crecimiento vegetal y el control de fitopatógenos.

2.4. Métodos

2.4.1. Reactivación de las bacterias

Las cepas *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 fueron reactivadas en los medios de caldo cultivo King's B y caldo nutritivo, respectivamente, fueron incubados hasta que se observó crecimiento bacteriano. Se realizaron tinción de Gram, pruebas de oxidación y

fermentación en medio O/F para comprobar que el cultivo estuviera axénico.

Para corroborar el nombre científico de las cepas J19 y TP22 se realizó la identificación molecular, se extrajo el ADN de las bacterias empleando el kit microbiano DNeasy UltraClean y el método de CTAB-PVP-Sílica (Huanca *et al.*, 2015). El ADN genómico se observó en gel de agarosa al 1% preparado en tampón TAE 1X. Se amplificó el gen del ARNr 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se emplearon cebadores específicos de bacterias 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') (Frank *et al.*, 2008). La mezcla de reacción contuvo 1,0 U Taq ADN polimerasa, 200 μ M de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), tampón de reacción 1X, 0,75 mM de $MgCl_2$ y 0,5 mM de cada cebador (Muñoz *et al.*, 2017). La PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos y 40 ciclos: 95 °C durante 45 s, 55 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s. Se incluyó un paso final de elongación de 72 °C durante 10 minutos. Las reacciones de amplificación se realizaron en un Veriti™ Termociclador de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1,0%. La secuenciación fue realizada por Macrogen, Seúl, República de Corea. El secuenciado se editó manualmente utilizando el software ChromasPro para eliminar bases de baja calidad (Muñoz *et al.*, 2023). Las secuencias parciales fueron comparadas con GenBank empleando el software BLAST 2.13.0 (Altschul *et al.*, 1990).

2.4.2. *Caracterización funcional*

- **Producción de sideróforos.** La producción de sideróforos se determinó mediante el método Chrome Azurol S (CAS) descrito por Schwyn & Neilands (1987), en el que 200 μ L de sobrenadante bacteriano se mezcló con 200 μ L de solución CAS. Posterior a los 20 minutos, la formación de un color naranja a partir del color azul indicó producción de sideróforos.
- **Producción de auxinas.** La producción de ácido indol-3-acético (IAA) fue determinada por el método colorimétrico de Salkowski (Ehmann, 1977). El sobrenadante bacteriano se mezcló con el reactivo de Salkowski en una proporción de 1:1. Posterior a los 5 minutos, la formación de un color rojo a partir de color amarillo es indicativo de la producción de IAA.
- **Solubilización de fosfato.** Se utilizó medio sólido de Pikovskaya (PVK) para determinar la solubilización de fosfato inorgánico de acuerdo con lo descrito por Pikovskaya (1948). La aparición de una zona transparente alrededor de las colonias bacterianas sobre un fondo blanco después de la incubación es indicativa de la solubilización del fosfato.

- **Fijación de nitrógeno.** Se utilizó medio semisólido NFb para detectar la capacidad de fijar nitrógeno por cada bacteria aislada de acuerdo a lo descrito por Rodríguez (1982). La fijación de nitrógeno fue determinada por la formación de una película blanquecina sub-superficial "similar a un velo" después de la incubación de 7 días a una temperatura ambiente.
- **Producción de quitinasas.** La producción de quitinasas se determinó en medio agar quitina coloidal, pH 7,0 de acuerdo a lo descrito por Verma & Garg (2019). Se inoculó la bacteria en el medio y se incubó por 7 días a temperatura ambiente. Un halo transparente en un fondo blanco es indicativo de presencia de quitinasas.
- **Producción de proteasas.** La actividad de proteasa fue determinada en agar leche descremada de acuerdo a lo descrito por Vijayaraghavan & Vincent (2013). La actividad proteolítica aparece como una zona transparente en un fondo blanco después de la incubación de 48 horas a temperatura ambiente.
- **Producción de lipasas.** Los microorganismos aislados fueron inoculados en placas de agar Tween 80 suplementadas con 0,1 g/L de CaCl₂ según el protocolo descrito por Slifkin (2000). La presencia de un halo blanco alrededor del microorganismo es indicativa de la producción de lipasa.

- **Producción de celulasas.** Los microorganismos aislados fueron inoculados en agar CMC e incubados por cinco días a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se agregó solución de Rojo de Congo al 0,1% hasta cubrir la totalidad de la placa durante 20 minutos y luego se retiró el exceso. Posteriormente, se lavaron con una solución NaCl 1M de acuerdo a lo descrito por Ramírez (2017).. La presencia de un halo transparente en un fondo rojo es indicativa de la producción de celulasa

- **Actividad de la enzima ACC desaminasa.** La actividad de la ACC desaminasa se midió cultivando bacterias con 3 mM de ACC (Merck) como única fuente de nitrógeno de acuerdo a lo descrito por Gaete *et al.* (2020), el crecimiento de la bacteria se consideró como positivo para la producción de ACC desaminasa.

- **Producción de HCN.** La producción de HCN se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Schippers *et al.* (1990). Se utilizó tiras de papel filtro humedecido con solución picrato (ácido pícrico al 0,5% en una solución de carbonato de sodio al 2%), fijados en la tapa de la placa de Petri, y la base contiene el cultivo de césped en medio King's B modificado con 4,4 g de glicina e incubado a 28 °C. Un cambio de color de amarillo a naranja – marrón del papel en 48 horas fue indicativo de producción de HCN.

2.4.3. Tolerancia de las bacterias a sal y boro

La tolerancia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 a condiciones salinas fue determinada utilizando medio líquido King's B suplementado con 0 – 30 g/L de NaCl. La tolerancia del boro fue determinada utilizando medio King's B con 0 – 300 ppm de H₃BO₃. La mezcla consiste en medio King's B suplementado con 0,86 g/L NaCl y 114 ppm de H₃BO₃ (1X) que es similar a las características del agua de riego de Lluta. Además, el medio se aumentó 8 veces su concentración sobre el agua de irrigación del río Lluta, para determinar la tolerancia de la bacteria bajo condiciones extremas de agua de la región. Para la medición del crecimiento bacteriano se tomó una alícuota de 1,5 mL y se midió el aumento de célula de la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) usando un espectrofotómetro (Muñoz *et al.*, 2021; Torres & Acevedo, 2008).

2.4.4. Optimización de las condiciones de cultivo y determinación de la curva de crecimiento bacteriano óptimo

A partir de las dos bacterias seleccionadas se realizó la optimización del crecimiento bacteriano para obtener cantidades consistentes de células bacterianas, por la cual se modificó la agitación (0 rpm, 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm y 200 rpm), la temperatura (25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C) y el pH (5,0 a 8,0) (Anexo 7). Se realizó una curva de crecimiento tomando alícuotas de 1,5 mL de medio de cultivo inoculado con cada bacteria seleccionada. El crecimiento bacteriano se

evaluó mediante el aumento de la OD₆₀₀ usando un espectrofotómetro. Se realizó experimentos en matraz hasta la fase estacionaria y un volumen final de 200 mL. El efecto de estas se obtuvo mediante curvas de crecimiento y calculando el tiempo generacional (g) y la tasa de crecimiento microbiano (μ), el tiempo generacional se determinó de la ecuación: $g = \text{Log } 2 / m$, donde m es la pendiente de la recta, la cual se obtiene a partir de valores de absorbancia y el tiempo de incubación durante la fase de crecimiento exponencial del microorganismo. La tasa de crecimiento se determinó con la ecuación: $\mu = 1/g$, donde g es el tiempo generacional, con la finalidad de obtener parámetros óptimos. A partir de los parámetros óptimos se realizó la curva de crecimiento y este es comparado con la curva de crecimiento con parámetros no óptimos como temperatura ambiente, sin agitación y pH neutro (Muñoz *et al.*, 2021).

2.4.5. Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 en *Zea mays* L. (maíz “Lluteño”)

La evaluación de PGP se realizó en plantas de *Zea mays* L. tipo amylacea (maíz “Lluteño”), cuyas semillas poseen denominación de origen. Las semillas de maíz “Lluteño”, fueron desinfectadas con etanol al 95% durante 2 minutos, hipoclorito de sodio al 2% durante 2 minutos y etanol al 70% durante 2 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada durante 2 minutos cada vez. Las semillas germinadas fueron transferidas a una cámara húmeda estéril y oscura. Luego de la germinación, las plántulas de *Zea mays* L. tipo

amylacea (maíz “Lluteño”) fueron transferidas a macetas (50% de turba y 50% de vermiculita) y se mantuvieron en un invernadero. Se aplicó cada tratamiento una semana antes del trasplante y al momento de trasplante de las plántulas. Las plántulas de maíz “Lluteño” fueron inoculadas con cada tratamiento una vez a la semana durante un mes en la base del tallo, usando una concentración de las bacterias J19 y TP22 de 1×10^6 UFC. Como control se utilizó plántulas de maíz tratadas solo con agua. Las plantas fueron regadas diariamente con agua de riego del Valle de Azapa (conductividad eléctrica > 1 dS/m). El efecto de estas se midió obteniendo el peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz. Además, se midió la altura de planta y se cuantificó el número de hojas.

2.4.6. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de Pseudomonas aeruginosa cepa J19 y de Anaerobiospirillum succiniciproducens cepa TP22

El ensayo de inhibición del crecimiento *in vitro* de los hongos fitopatógenos se realizó en placas de agar papa dextrosa (PDA), utilizando los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum*, *Macrophomina phaseolina* y *Monilinia fructicola*. Los hongos fueron sembrados en el centro de la placa y se inoculó 15 μ L de las bacterias en pocillos que rodean al hongo de acuerdo a lo descrito por Sepúlveda *et al.* (2020). Como control se utilizó placas con el hongo solo en el centro. La inhibición del crecimiento micelial radial (IMRG) del hongo se calculó usando la ecuación:

$$\text{IMRG} = \left[\frac{C - T}{C} \right] \times 100$$

Donde: **C** es el radio de crecimiento del hongo en placa de control y **T** es el radio de crecimiento del hongo en tratamiento (Gaete *et al.*, 2022; Muñoz *et al.*, 2021).

2.4.7. Evaluación de la capacidad biocontroladora de Pseudomonas aeruginosa cepa J19 y de Anaerobiospirillum succiniciproducens cepa TP22 contra Fusarium oxysporum de las plantas de Zea mays

Para determinar el efecto biocontrolador de las bacterias cepa J19 y TP22, se realizó un experimento en macetas con plantas maíz variedad GSS3951 (Syngenta®). Las plántulas fueron trasplantadas en macetas al momento de aparecer la primera hoja verdadera. Luego de 10 días del trasplante se incorporó el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Para la inoculación de plantas de maíz se aplicó a cada planta 1 mL de suspensión de conidias ajustada a 1×10^6 conidios/mL. Para ello se realizó el recuento de esporas con la cámara de Howard con una suspensión de esporas que se obtuvo a partir del hongo en estudio crecido en PDA con aproximadamente 14 días. La remoción de esporas se realizó adicionando 5 mL de suero fisiológico estéril a la placa de Petri. Las plantas infectadas fueron tratadas con las bacterias de estudio y el producto comercial en los días 5, 15 y 25 después del trasplante. La concentración de la cepa J19 y TP22 fueron 1×10^6 UFC.

Por último, se realizó el reaislamiento a partir de muestras de aproximadamente 1 cm de tallos con síntomas de pudrición, luego se

desinfectó con etanol al 96°, cloro al 2%, etanol 70° con 2 minutos por cada una de las soluciones y se lavaron con agua destilada estéril por 2 minutos. Se colocaron los fragmentos del tallo en placas de Petri con el medio agar papa dextrosa (PDA) e incubaron a temperatura ambiente. Luego se realizó una resiembra para la obtención del hongo (*Fusarium oxysporum*) por un periodo de catorce días, luego se realizó la tinción con azul de tripano para observar microscópicamente (Anexo 5).

2.4.8. Evaluación *in vitro* de la actividad biocontroladora de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 contra la maleza *Cenchrus echinatus*

El ensayo *in vitro* se realizó con la inhibición germinativa de la maleza *Cenchrus echinatus* (cadillo) en cámaras húmedas. Las semillas de maleza fueron desinfectadas con etanol al 95% durante 2 minutos, hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos, etanol al 70% durante 2 minutos, luego se realizó los tres lavados con agua destilada esterilizada durante 2 minutos cada vez. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en placas de Petri con medio PDA e incubadas por 48 horas. Pasado el tiempo se unió las bases de las placas de Petri de las semillas de maleza en medio PDA y la placa de Petri que contiene los inóculos de las bacterias cepa J19 y cepa TP22, las cuales fueron sembradas previamente por agotamiento en medio King's B suplementado con glicina. Las placas fueron selladas con Parafilm e incubadas a 28 °C por 92 horas más. El efecto tóxico de la bacteria contra la maleza se

determinó mediante el índice del porcentaje de germinación residual normalizado (IGN) y de elongación radical residual normalizado (IER).

El IGN se determinó mediante la ecuación:

$$IGN = \frac{(Germ_x - Germ_{Testigo})}{Germ_{Testigo}}$$

Donde: **Germ_x** es el porcentaje promedio de semillas germinadas en presencia del inóculo bacteriano y **Germ_{Testigo}** es el porcentaje de semillas germinadas sin inocular.

El IER se determinó mediante la ecuación:

$$IER = \frac{(Elong_x - Elong_{Testigo})}{Elong_{Testigo}}$$

Donde: **Elong_x** es la longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas en presencia del inóculo bacteriano y **Elong_{Testigo}** es la longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas sin inocular.

III. RESULTADOS

3.1. Reactivación de las bacterias

La cepa J19 mostró células en forma bastón recto Gram negativos, y la cepa TP22, asociaciones de dos células en forma de bastón recto Gram positivos y negativos. La cepa J19 produjo ácidos a partir de D-glucosa y D-galactosa como fuente de carbono. La cepa TP22 produjo ácidos a partir de D-glucosa, D-celobiosa, D-rafinosa, D-manitol, D-sorbitol, sacarosa y lactosa como fuente de carbono (Tabla 2).

3.2. Caracterización funcional de las bacterias

La cepa J19 fijo nitrógeno, solubilizó fosfato, produjo sideróforos, auxinas y la enzima ACC desaminasa y produjo HCN también produjo las enzimas proteasas, celulasas y lipasas que le permite degradar proteínas, celulosa y lípidos, respectivamente. La cepa TP22 fijo nitrógeno y produjo las enzimas proteasas y quitinasas, que le permite degradar proteínas y quitina (Tabla 3).

Tabla 2

Características microbiológicas de P. aeruginosa cepa J19 y de A. succiniciproducens. cepa TP22

Características	Cepa J19	Cepa TP22
Afiliación	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>
% de similitud	99,78 %	66,26 %
Tinción Gram	-	-/+
Producción de ácido:		
L-Asparagina	-	-
D-Glucosa	+	+
D-Galactosa	+	-
D-Celobiosa	-	+
D-Melibiosa	-	-
D-Fructosa	-	-
D-Ramnosa	-	-
D-Rafinosa	-	+
D-Manitol	-	+
D-Sorbitol	-	+
D-Inositol	-	-
Lactosa	-	+
Sacarosa	-	+

Nota. La reacción positiva se indica como + y una reacción negativa se indica como -.

Tabla 3

Caracterización funcional de P. aeruginosa cepa J19 y A. succiniciproducens cepa TP22

Características	Cepa J19	Cepa TP22
Producción de proteasas	+	+
Producción de celulasas	+	-
Producción de lipasas	+	-
Producción de quitinasas	-	+
Producción de auxinas	+	-
Producción de sideróforos	+	-
Solubilización de fosfato	+	-
Fijación de nitrógeno	+	+
ACC desaminasa	+	-
Producción de HCN	+	-

Nota. La reacción positiva se indica como + y una reacción negativa se indica como –

3.3. Tolerancia de las bacterias a sal y boro

Las bacterias J19 y TP22 fueron crecidas en medio de cultivo suplementado con NaCl y/o ácido bórico (Tabla 4). Ambas bacterias mostraron un crecimiento a 8 g/L de NaCl similar a las condiciones estándar (medio King B sin NaCl ni ácido bórico). Además, ambas bacterias mostraron crecimiento abundante en medio de cultivo suplementado con NaCl y ácido bórico a concentraciones 1, 2, 4 y 8 veces superior al agua de riego de Lluta (0,86 g/L NaCl y 114 ppm de H₃BO₃). Por otra parte, las bacterias J19 y TP22 mostraron

un crecimiento menor a 15 y 30 g/L de NaCl; y a 10, 100 y 300 ppm de ácido bórico; y medio de cultivo suplementado con agua de riego del río Lluta.

Tabla 4

Tolerancia a NaCl y H₃BO₃ de P. aeruginosa cepa J19 y de A. succiniciproducens cepa TP22

Condición	Crecimiento bacteriano (OD ₆₀₀)	
	Cepa J19	Cepa TP22
Control	0,76 ± 0,14	1,23 ± 0,43
8 g/L NaCl	0,76 ± 0,05	1,02 ± 0,03
15 g/L NaCl	0,68 ± 0,08	0,98 ± 0,05
30 g/L NaCl	0,48 ± 0,06	0,42 ± 0,01
10 ppm H ₃ BO ₃	0,62 ± 0,06	0,86 ± 0,04
100 ppm H ₃ BO ₃	0,56 ± 0,01	0,83 ± 0,05
300 ppm H ₃ BO ₃	0,58 ± 0,03	0,81 ± 0,02
Agua de río Lluta	0,33 ± 0,03	0,74 ± 0,01
1x agua de Lluta	0,83 ± 0,22	1,52 ± 0,14
2x agua de Lluta	0,89 ± 0,09	1,55 ± 0,11
4x agua de Lluta	0,81 ± 0,09	1,50 ± 0,16
8x agua de Lluta	0,75 ± 0,02	1,47 ± 0,01

Nota: El medio de cultivo suplementado 1X (concentración a 0,86 g/L NaCl y

114 ppm de H₃BO₃)

3.4. Optimización de las condiciones de cultivo

Las condiciones óptimas de pH, agitación y temperatura de las cepas J19 y TP22 permitió determinar la tasa de crecimiento microbiano (μ) más alta y tiempo generacional (g) más bajo (Tabla 5). Cuando se empleó una agitación de 200 rpm la cepa J19 mostró μ (0,76 h⁻¹) y la g (1,32 h), mientras la cepa TP22 mostró μ (0,89 h⁻¹) y la g (1,13 h). Se observó una temperatura óptima de 30 °C para la cepa J19, con una tasa de crecimiento microbiano más alta (0,52 h⁻¹) y tiempo generacional más bajo (1,93 h). De distinta forma, la cepa

TP22 mostró una temperatura óptima de crecimiento de 35 °C, con una tasa de crecimiento microbiano más alta ($0,99 \text{ h}^{-1}$) y tiempo generacional más bajo (1,01 h). Se observó el pH óptimo cuando el medio de cultivo fue tamponado a pH 5,5 para la cepa J19 con μ ($0,58 \text{ h}^{-1}$) y g (1,72 h). Cuando el cultivo de la cepa TP22 fue tamponado a pH 7,5, se registró un μ ($0,82 \text{ h}^{-1}$) y la g (1,22 h).

3.5. Determinación de la curva de crecimiento bacteriano en condiciones óptimas

Se determinó la curva de crecimiento bacteriano mediante los datos de la OD_{600} , como se muestra en el Anexo 6. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 en condiciones óptimas (30 °C, 200 rpm y pH 5,5) mostró un incremento en el crecimiento (fase exponencial) después de 4 horas de incubación y alcanzó su fase estacionaria a las 10 horas de incubación. En el caso de la bacteria *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 la fase exponencial comenzó después de 4 horas de incubación y alcanzó su fase estacionaria a las 11 horas de incubación en condiciones óptimas con una temperatura de 35 °C, agitación 200 rpm y pH 7,5. Sin embargo, la curva de crecimiento de las cepas J19 y TP22 en condiciones no optimizadas se observa la fase de latencia entre las 0 y 12 horas (Figura 1).

Tabla 5

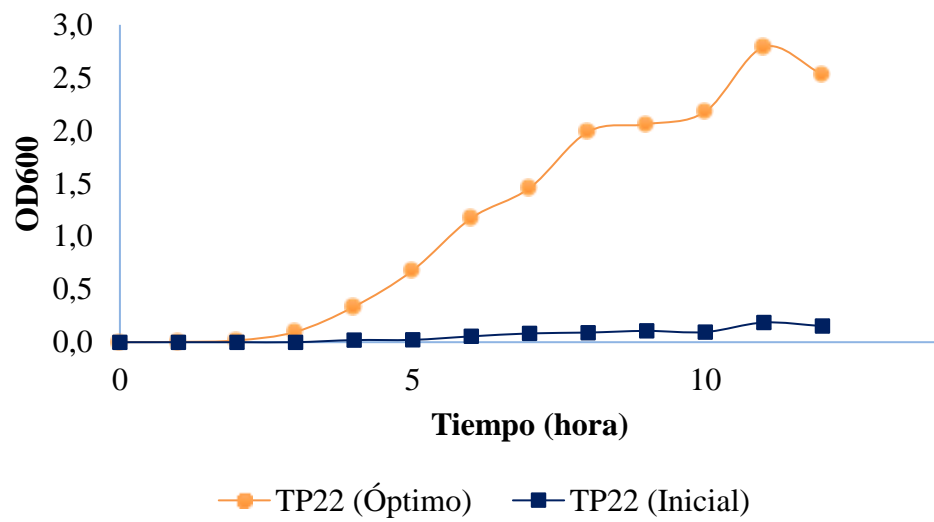
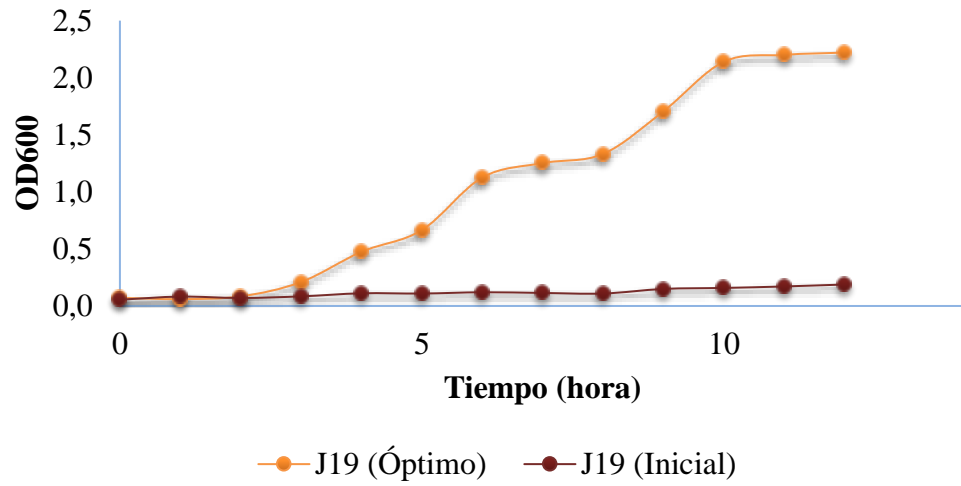
Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de la P. aeruginosa cepa J19 y de A. succiniciproducens cepa TP22.

Parámetro	Cepa J19		Cepa TP22		
	g (h)	μ (h ⁻¹)	g (h)	μ (h ⁻¹)	
Agitación (rpm)					
	0	11,11	0,09	8,78	0,11
	50	6,30	0,16	7,03	0,14
	100	2,53	0,39	1,76	0,57
	150	1,83	0,55	1,24	0,80
	200	1,32	0,76	1,13	0,86
Temperatura (°C)					
	25	8,36	0,12	13,68	0,07
	30	1,93	0,52	1,24	0,80
	35	2,70	0,37	1,01	0,99
	40	2,01	0,50	1,44	0,70
pH					
	5,0	2,49	0,40	N. D	N. D
	5,5	1,72	0,58	N. D	N. D
	6,0	1,86	0,54	1,42	0,70
	6,5	1,93	0,52	1,61	0,62
	7,0	1,93	0,52	1,36	0,74
	7,5	1,92	0,52	1,22	0,82
	8,0	1,97	0,51	1,25	0,80
	8,5	N. E	N. E	1,27	0,79
	9,0	N. E	N. E	1,74	0,57

Nota: No determinado (N. D) y no evaluado (N. E)

Figura 1

Curva de crecimiento óptimo de *P. aeruginosa* cepa J19 (A) y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 (B)



3.6. Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 en maíz “Lluteño”

Referente a la promoción del crecimiento vegetal, de la variable altura, número de hojas, peso fresco y seco del follaje, los tratamientos de la cepa J19 y TP22 no mostraron diferencia significativa respecto al control y BacNorte (*Bacillus velezensis*). En tanto la variable peso fresco de la raíz, el tratamiento BacNorte mostró diferencia significativa respecto al control, cepa J19 y cepa TP22. Sin embargo, la variable peso seco de raíz, los tratamientos cepa J19 y cepa TP22 mostraron diferencia significativa respecto al control y BacNorte (Tabla 6, Tabla 7 y Figura 2). En cuanto a la altura de la planta, la cepa J19 mostró un ligero aumento a partir del día 5, mientras, la cepa TP22 mostró una tendencia a disminuir su crecimiento a partir del día 15 (Figura 3). Respecto al número de hojas, la cepa J19 y TP22 mostraron una tendencia a aumentar el desarrollo de hojas desde el primer día (Figura 4).

Tabla 6

Efecto de la aplicación de la bacteria P. aeruginosa cepa J19 en plantas de maíz “Lluteño”

	Control	BacNorte	Cepa J19	Veces
Altura de planta (cm.)	171,71 ± 14,95 ^a	168,39 ± 16,46 ^a	173,74 ± 25,20 ^a	1,01*/ 1,03 ^x
Número de hojas	10,53 ± 0,74 ^a	10,60 ± 0,83 ^a	11,20 ± 0,86 ^a	1,06*/ 1,06 ^x
Peso fresco del follaje(g)	264,53 ± 38,84 ^a	236,80 ± 32,02 ^a	266,53 ± 48,16 ^a	1,01*/ 1,13 ^x
Peso seco del follaje (g)	37,32 ± 3,26 ^a	34,16 ± 2,78 ^a	37,10 ± 5,04 ^a	1,00*/ 1,09 ^x
Peso fresco de la raíz (g)	99,07 ± 28,59 ^a	61,47 ± 17,39 ^b	82,53 ± 32,00 ^a	0,83*/ 1,34 ^x
Peso seco de la raíz (g)	21,32 ± 2,97 ^a	19,31 ± 1,41 ^a	22,19 ± 3,64 ^b	1,04*/ 1,15 ^x

Nota: Las medias con letras iguales no son significativamente diferentes entre sí (HSD Tukey) a significancia de 0,05. Comparación de la cepa J19 con el control (*) y la comparación de la bacteria con el producto comercial BacNorte (x)

Tabla 7

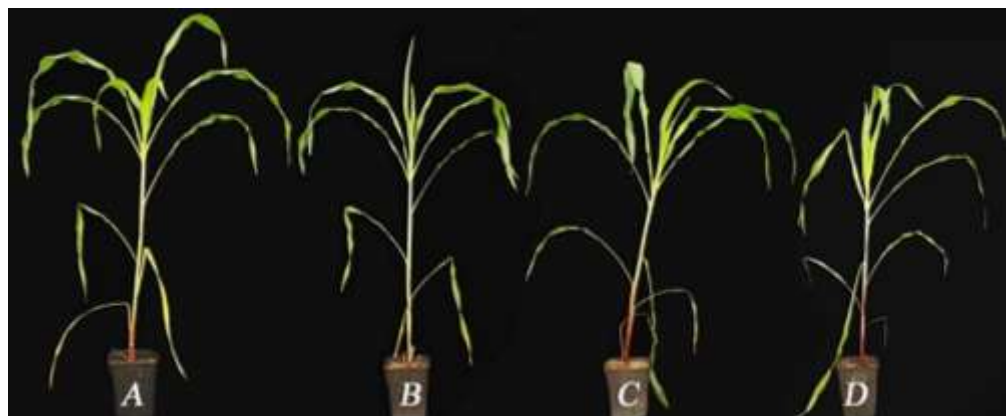
Efecto de la aplicación de la bacteria A. succiniciproducens cepa TP22 en plantas de maíz “Lluteño”

	Control	BacNorte	Cepa TP22	Veces
Altura de planta (cm.)	171,71 ± 14,95 ^a	168,39 ± 16,46 ^a	170,37 ± 26,57 ^a	0,99*/ 1,01 ^x
Número de hojas	10,53 ± 0,74 ^a	10,60 ± 0,83 ^a	11,13 ± 1,36 ^a	1,05*/1,05 ^x
Peso fresco del follaje (g)	264,53 ± 38,84 ^a	236,80 ± 32,02 ^a	247,20 ± 39,15 ^a	0,93*/1,04 ^x
Peso seco del follaje (g)	37,32 ± 3,26 ^a	34,16 ± 2,78 ^a	35,32 ± 6,11 ^a	0,95*/1,03 ^x
Peso fresco de la raíz (g)	99,07 ± 28,59 ^a	61,47 ± 17,39 ^b	83,47 ± 32,90 ^a	0,84*/ 1.36 ^x
Peso seco de la raíz (g)	21,32 ± 2,97 ^a	19,31 ± 1,41 ^a	22,04 ± 3,25 ^b	1,03*/ 1,14 ^x

Nota: Las medias con letras iguales no son significativamente diferentes entre sí (HSD Tukey) a significancia de 0,05. Comparación de la cepa TP22 con el control (*) y la comparación de la bacteria con el producto comercial BacNorte (x)

Figura 2

Capacidad bioestimulante de *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 en maíz “Lluteño”



Nota: *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 (A); *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 (B); Control (C) y BacNorte (D)

Figura 3

Media y desviación estándar de la altura de las plantas de maíz “Lluteño” tratadas en un periodo de 33 días ($n = 15$ plantas por tratamiento)

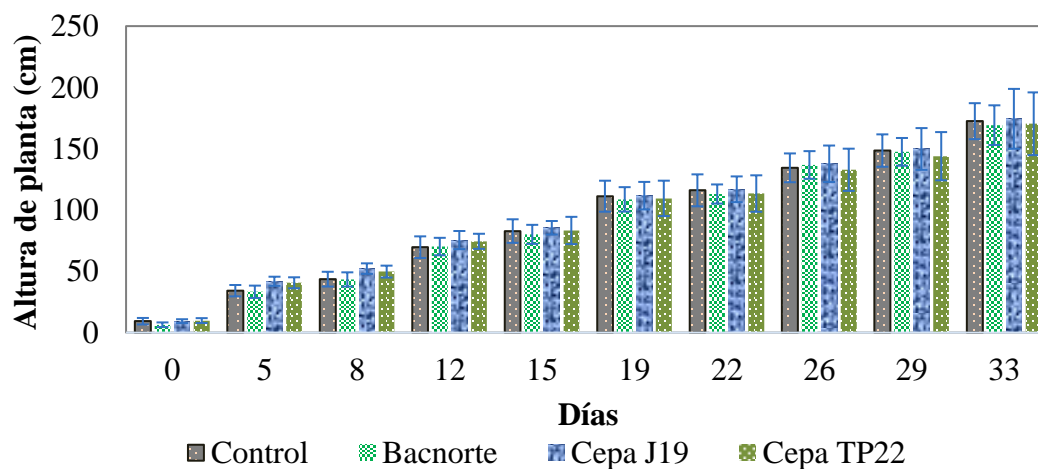
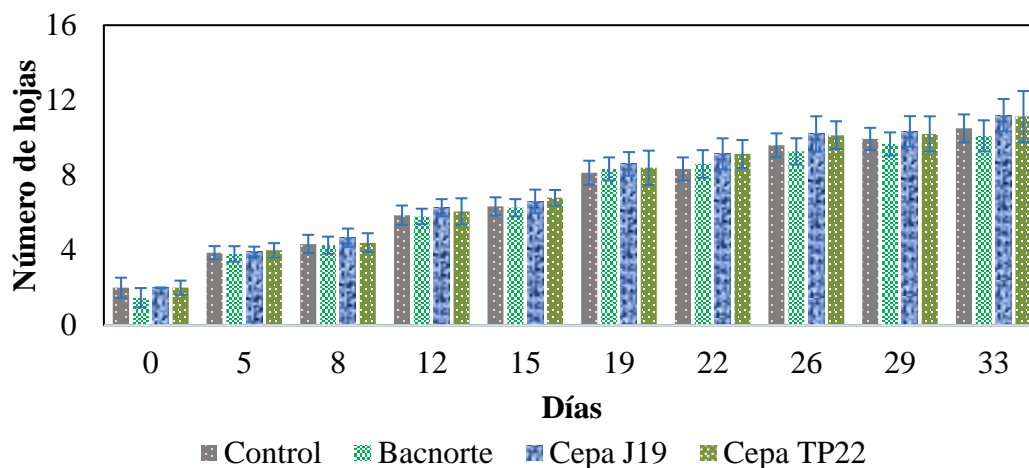


Figura 4

Media y desviación estándar de número de hojas en plantas de maíz “Lluteño” tratadas en un periodo de 33 días (n = 15 plantas por tratamiento)



3.7. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22

La actividad antifúngica *in vitro* de las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 evidenció su capacidad de controlar a cinco hongos fitopatógenos de estudio (Tabla 8). La exposición de la cepa J19 a estos hongos mostró un mayor IMRG contra *Monilinia fruticola* (93,8%), *Botrytis cinerea* (61,8%), *Geotrichum candidum* (57,8%) y *Fusarium oxysporum* (56%). Por otra parte, la exposición de la cepa TP22 a estos hongos mostró un mayor IMRG contra *Monilinia fruticola* (74,1%), *Botrytis cinerea* (60,5%), *Geotrichum candidum* (52,4%) y *Macrophomina phaseolina* (62,4%).

Tabla 8

Actividad antifúngica in vitro de las bacterias P. aeruginosa cepa J19 y de A. succiniciproducens cepa TP22 contra hongos fitopatógenos. El error corresponde a la desviación estándar

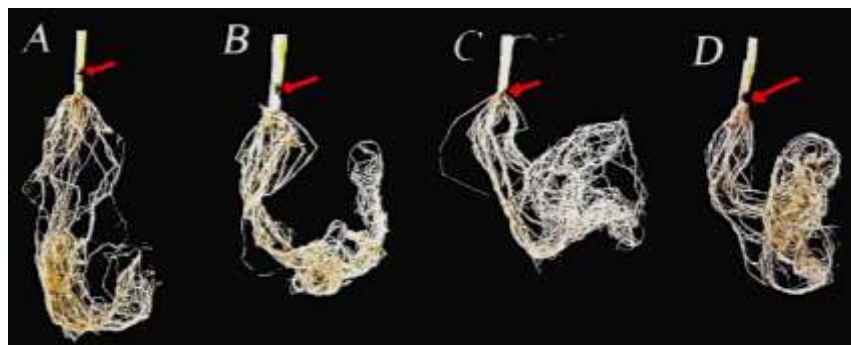
Hongo	IMRG (%)	
	Cepa J19	Cepa TP22
<i>Monilinia fructicola</i>	93,8 ± 0,1	74,1 ± 0,1
<i>Botrytis cinerea</i>	61,8 ± 0,2	60,5 ± 0,1
<i>Geotrichum candidum</i>	57,8 ± 0,1	52,4 ± 0,2
<i>Fusarium oxysporum</i>	56,0 ± 0,1	47,6 ± 0,1
<i>Macrophomina phaseolina</i>	40,0 ± 0,1	62,4 ± 0,1

3.8. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 contra *Fusarium oxysporum* de las plantas de *Zea mays*

El efecto de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 en las plantas de maíz variedad GSS3951 (Syngenta®) infectadas con *Fusarium oxysporum* mostraron síntomas leves en los tratamientos cepa J19, cepa TP22, Serenade® que corresponde a *Bacillus subtilis* y control, siendo estos de grado 1 (puntos necróticos en la base del tallo) de acuerdo a la escala de Apodaca *et al.* (2004) como se muestra en la Figura 5. La evaluación del peso fresco de plantas expuestas no mostró una diferencia significativa entre los tratamientos de la cepa J19, cepa TP22, Serenade® y control (Figura 6).

Figura 5

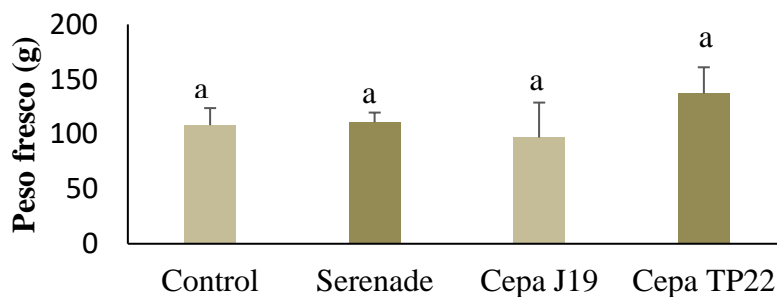
Efecto biocontroladora *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 contra *F. oxysporum* en plantas de maíz variedad GSS3951.



Nota: Control (A); Serenade® (B); *P. aeruginosa* cepa J19 (C) y *A. succiniciproducens* cepa TP22 (D)

Figura 6

Peso fresco de las plantas de maíz variedad GSS3951 expuesta a *F. oxysporum* y tratadas con *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22



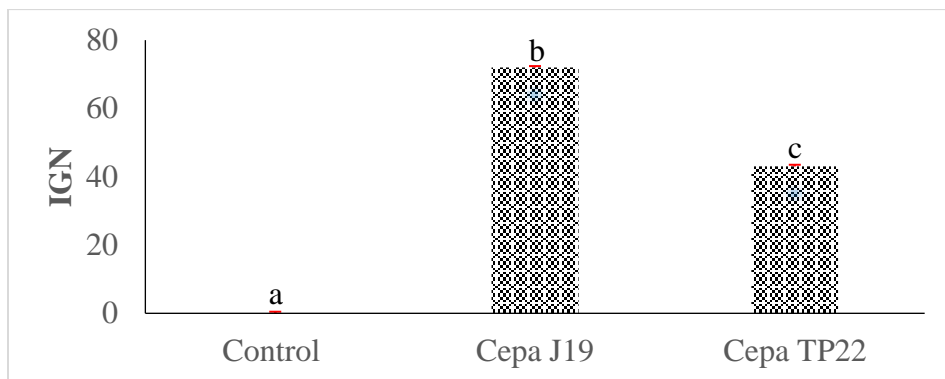
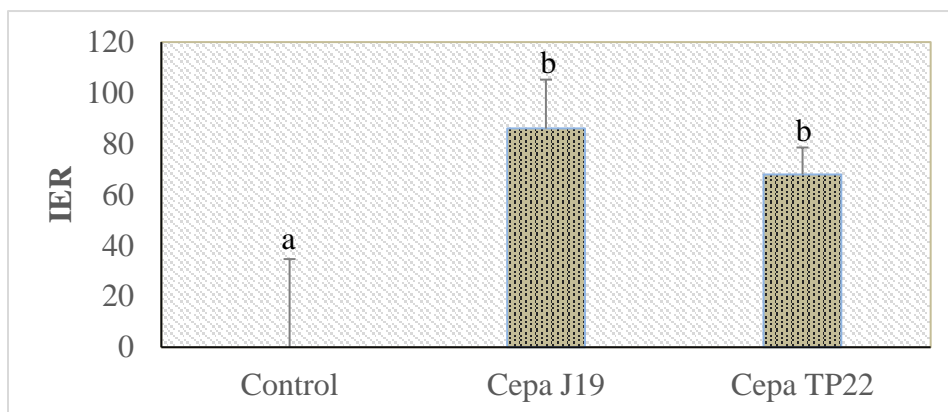
Nota: El error corresponde a la desviación estándar. Las medias con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)

3.9. Evaluación *in vitro* de la actividad biocontroladora de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 contra la maleza *Cenchrus echinatus* (cadillo)

Referente al efecto inhibitorio de *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 mostró efectividad en el biocontrol de la maleza *Cenchrus echinatus* (cadillo), los tratamientos cepa J19 y cepa TP22 mostraron diferencia significativa respecto al control en la elongación radicular, inhibiendo el crecimiento de la maleza en un 86% para la cepa J19 y 68% para la cepa TP22. En cuanto al efecto inhibitorio en la germinación de la maleza, los tratamientos cepa J19, cepa TP22 y control mostraron diferencia significativa, la cepa J19 mostró un mayor efecto inhibitorio con un 72% y la cepa TP22 mostró una ligera disminución con un 43% (Figura 7). De acuerdo a la categorización de Bagur *et al.*, (2011), la bacteria *P. aeruginosa* cepa J19 mostró una alta toxicidad en el IGN (-0,72) y una toxicidad muy alta en el IER (-0,86), mientras que la cepa TP22 mostró una toxicidad moderada en IGN (-0,43) y una toxicidad alta en el IER (-0,69).

Figura 7

Efecto de las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 sobre el índice del porcentaje de germinación (IG) y longitud de la radícula de *C. echinatus*



Nota: El error corresponde a la desviación estándar. Las medias con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)

IV. DISCUSIÓN

En los últimos años, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal han generado un gran interés en la agricultura sostenible (Vejan *et al.*, 2016), ya que son capaces de mitigar el uso frecuente de productos agroquímicos que alteren el microbioma de los suelos, y el estrés abiótico y biótico en las plantas (Mandal *et al.*, 2020; Muñoz, 2018). Por tanto, la aplicación de Bioproductos a base de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que estimula el crecimiento de las plantas y el rendimiento de cultivos frente a estrés biótico y abiótico (Qin *et al.*, 2016). Sin embargo, los bioproductos comerciales actuales no son funcionales en regiones con condiciones edafoclimáticas diferentes a donde se originó el bioproducto (Muñoz, 2018; Starobinsky *et al.*, 2021). Por tanto, es necesario el estudio de microorganismos endémicos efectivos bajo las condiciones edafoclimáticas de las zonas áridas y semiáridas como es la región de Arica y Parinacota.

En el presente estudio, las cepas J19 y TP22 son miembros de los géneros *Pseudomonas* y *Anaerobiospirillum*, respectivamente, mostrando una mayor similitud con *P. aeruginosa* (99,78 %) y *A. succiniciproducens* (66,26 %). La bacteria *P. aeruginosa* es una bacteria oportunista, ampliamente distribuida en el ambiente, sin embargo, presenta un potencial en la industria alimentaria, cosmética, del biocontrol, promotora del crecimiento vegetal y la biorremediación de suelos, ya que producen

metabolitos, fitohormonas y aditivos (polímeros glicosídicos) que se utilizan en cosméticos y alimentos (Weimer *et al.*, 2020). Por otra parte, la bacteria *A. succiniciproducens* es un microorganismo anaerobio estricto, considerada como patógeno, sin embargo, es de interés industrial por su producción de ácidos orgánicos utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y en la industria de los pesticidas (Avila, 2019; Chialva & Griffa, 2020).

Por otra parte, la producción de células bacterianas requiere de un método accesible y en menor tiempo como es optimizar las condiciones de crecimiento bacteriano a través de factores ambientales como la temperatura, pH, agitación, entre otros (Ren *et al.*, 2019). Las condiciones de crecimiento bacteriano óptimas pueden ser demostradas a través de parámetros como son: tiempo de generación y tasa de crecimiento. Además, el tiempo de generación está ligado a la tasa de crecimiento y este último está condicionado por factores ambientales. El tiempo de generación es el tiempo que tarda en duplicarse las células bacterianas y se determina mediante la pendiente de la curva de crecimiento exponencial. Por otra parte, la tasa de crecimiento consiste en el aumento de células bacterianas en un determinado tiempo (Dos Santos, 2007). Para la bacteria *A. succiniciproducens* cepa TP22 se determinaron condiciones óptimas a 35 °C, pH 7,5 y agitación 200 rpm. En el caso de *P. aeruginosa* cepa J19, la bacteria mostró un crecimiento óptimo a 30 °C, pH 5,5 y agitación 200 rpm (Tabla 4). En otro estudio realizado por Muñoz *et al.*, (2021), la bacteria *P. lini* cepa S57 mostró parámetros óptimos de 35 °C, pH 5,5 y agitación 150 rpm, presentando una similitud en el pH. Estos factores óptimos fueron determinados por tasas de crecimiento bacteriano más alta y tiempo de

generación más bajos, ambos parámetros están ligados con la población bacteriana y el tiempo.

Por otra parte, las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 mostraron tener la capacidad de tolerar condiciones salino – bóricas (Tabla 4). Muñoz *et al.*, (2021) también describió que la bacteria *P. lini* cepa S57 tolera condiciones salino – bóricas con concentraciones de 8 g/L NaCl, 15 g/L de NaCl y 10 ppm de H₃BO₃. Las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 presentan adaptabilidad natural a condiciones salino-bóricas y otros minerales, debido a su entorno geotermal. Por ende, a partir de estas bacterias se podrían desarrollar bioproductos efectivos en ambientes áridos y semiáridos, ya que algunos Bioproductos comerciales muestra resultados ambiguos en estos ambientes, debido a su efectividad en condiciones climáticas y de suelo donde se originó (Muñoz, 2018). Estos inoculantes microbianos ayudan a las plantas tolerar la salinidad, estrés por sequía y fitopatógenos, además de estimular el crecimiento de las plantas (Qin *et al.*, 2016).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal producen metabolitos como fitohormonas, la enzima ACC desaminasa, sideróforos, entre otros. Estos metabolitos actúan como reguladores del crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés abióticos y bióticos (Sorty *et al.*, 2018). Las bacterias del género *Pseudomonas* producen sideróforos como la pseudobactina que limita el hierro necesario para el desarrollo de patógenos (Canchignia *et al.*, 2015). La bacteria *P. aeruginosa* cepa J19 tiene la capacidad de producir IAA, sideróforos, solubilizar fosfato, fijar nitrógeno, y producir las enzimas ACC desaminasa, proteasa, celulasa y lipasa, similar *P. aeruginosa* cepa PS24 descrito por Uzair *et al.* (2018). Por otra parte, la cepa TP22 tiene la capacidad de fijar nitrógeno,

y producir las enzimas proteasa y quitinasa (Tabla 3). Las enzimas líticas como quitinasa, proteasa, celulasa y lipasa, son capaces de degradar la pared celular de fitopatógenos (Miljaković *et al.*, 2020). La enzima quitinasa es capaz de hidrolizar polímero β -1,4 glucosídicos de N-acetilglucosamina, este monosacárido es un componente de la quitina presente en el exoesqueleto de los insectos y pared celular de hongos (Rathore & Gupta, 2015). La enzima proteasa al igual que la quitinasa degrada la pared celular de los hongos (Ahmadzadeh & Sharifi, 2009). Además, la bacteria *A. succiniciproducens* produce ácidos orgánicos como el ácido succínico, ácido acético, ácido málico, entre otros en bajas concentraciones (Avila, 2019). La cepa J19 estimula el crecimiento de la parte radicular de maíz “Lluteño” utilizando agua de riego del Valle de Azapa con una conductividad eléctrica alta (> 1 dS/m) (Torres & Acevedo, 2008) y puede tolerar condiciones salino-bóricas (Tabla 4). Sin embargo, la cepa TP22 estimula el desarrollo de hojas (Tabla 6, Tabla 7, Figura 2 y Figura 3) y también puede tolerar condiciones salino-bóricas. Estos resultados están de acuerdo con la investigación realizada previamente por Reyes *et al.*, (2019) y Roychowdhury *et al.*, (2019) quienes mostraron un aumento en la parte radicular en plantas de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) por *Pseudomonas gessardii* cepa Tmt-16 y *Brassica juncea* (mostaza) por *P. aeruginosa* cepa PGP, respectivamente. En si las plantas dependen de la biodisponibilidad de macronutrientes y micronutrientes, las cuales en estrés abiótico altera las propiedades del suelo como salinidad, acidez, alcalinidad y contaminación por metales (Canchignia *et al.*, 2015).

La actividad biocontroladora *in vitro* de las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Anaerobiospirillum* contra hongos fitopatógenos son prometedoras para la agricultura de la región de Arica y Parinacota, siendo la región de mayor producción de hortalizas

como tomate, maíz, zapallo, entre otros (ODEPA, 2020). La cepa J19 inhibe el crecimiento de *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum* en un porcentaje mayor al 50%. Por otro parte, la cepa TP22 inhibe el crecimiento de *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum* y *Macrophomina phaseolina* (Tabla 8), similar a la bacteria *P. lini* S57, realizado por Muñoz *et al.* (2021). Respecto a la actividad biocontroladora contra *Fusarium oxysporum* en plantas de maíz variedad GSS3951 no se observaron diferencias significativas con relación a condiciones de control y el producto comercial Serenade® (Figura 4 y Figura 5). Este resultado podría deberse a una actividad antifúngica *in vitro* menor contra *F. oxysporum* y la colonización del hongo en la planta puede deberse a los transposones que representa más del 5% de su genoma, la cual genera variabilidad genética que presenta las subespecies o razas de *F. oxysporum* (Garces *et al.*, 2001).

Respecto a la actividad biocontroladora *in vitro* de las bacterias contra maleza como *C. echinatus* (cadillo), la cepa J19 inhibió la germinación en un 72% y un 86% en la elongación radical, mientras que la cepa TP22 inhibió la germinación en un 43% y un 68% en la elongación radical de *C. echinatus* (Figura 5). Se ha descrito que la bacteria *P. aeruginosa* cepa A52 tiene un alto potencial herbicida. Esta bacteria inhibió en un 75% y 50% del crecimiento de malezas como *Axonopus affinis* y *Lens esculenta* Moench, respectivamente (Pacheco *et al.*, 2015). Además, la bacteria *P. aeruginosa* inhibió por completo la germinación, crecimiento de raíces y brotes de las semillas de maleza dicotiledóneas y malezas invasivas, y una menor efectividad en monocotiledóneas. Las semillas que logran germinar presentan un crecimiento atrofiado debido a la presencia de quinolina y la exposición a niveles altos de HCN (Diaz *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2014).

Respecto al efecto fitotóxico de la cepa J19 mostró una alta toxicidad en el IGN, mientras que la cepa TP22 mostró una toxicidad moderada. La elongación radical es más importante que la germinación debido a los procesos fisiológicos y la presencia de sustancias tóxicas altera el desarrollo normal de la planta. Sin embargo, estas bacterias productoras de sustancia volátiles no necesariamente eliminan las malezas, pero podrían suprimir el crecimiento inicial de las malezas y permitir el desarrollo de las plantas cultivadas afectadas por la maleza (Pacheco *et al.*, 2015).

En este estudio, las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 mostraron tener un alto potencial agrícola y permitirá el desarrollo de nuevos bioproductos de uso agrícola. Sin embargo, para generar productos comerciales es necesario realizar estudios de formulaciones bacterianas y su viabilidad a compuestos estabilizadores durante el almacenamiento. Posteriormente, se realizará prototipos validados en campo con condiciones edafoclimáticas no controladas para determinar la eficacia y dosis. Por último, se realizaría el registro del producto y escalamiento comercial (Muñoz *et al.*, 2021; Starobinsky *et al.*, 2021).

V. CONCLUSIONES

- La cepa J19 y TP22 son bacterias extremotolerantes relacionadas con las bacterias *P. aeruginosa* en un 99,8% de similitud y *A. succiniciproducens* en un 66,3% de similitud, respectivamente. La cepa J19 presenta un alto potencial de promover el crecimiento vegetal por su capacidad de producir auxinas, sideróforos, enzimas líticas, HCN, fijar nitrógeno y solubilizar fósforo. La cepa TP22 promovió solo un ligero aumento del crecimiento de las plantas de maíz “Lluteño” por su capacidad de producir enzimas líticas y fijar nitrógeno
- Las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 inhibieron el crecimiento radial *in vitro* de 4 hongos fitopatógenos mayor al 50%.
- En biocontrol de la cepa J19 y cepa TP22 contra *F. oxysporum* no mostraron diferencia significativa en plantas de maíz infectadas, respecto a Serenade y control.
- Las bacterias *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22 inhibieron la germinación de semillas de maleza *Cenchrus echinatus* en un 72% y 43% respectivamente, por su capacidad de producir enzimas líticas.
- Estas cepas bacterianas presentan un alto potencial para ser empleados como bioproducto para el uso agrícola en zonas áridas.

VI. RECOMENDACIONES

- En los estudios posteriores a este trabajo en la que la cepa TP22 deberá ser manipulada molecularmente se sugiere aplicar la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) para conseguir la separación de sus fragmentos genómicos.
- En los estudios posteriores a este trabajo se sugiere realizar análisis por HPLC para determinar la producción de ácidos orgánicos por la cepa TP22.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, C., Röper, C., Mazuela, P., & Torres, A. (2015). Tenencia de tierra y aguas de pequeños y medianos agricultores. *Idesia (Arica)*, 33(4), 105–110.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292015000400013>
- Ahmadzadeh, M., & Sharifi, A. (2009). Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control*, 48(2), 101–107.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.10.012>
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Apodaca, M., Zavaleta, E., Osada, S., & García, R. (2004). Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 7–13.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222102>

- Avila, A. (2019). Evaluación de bagazo de *Agave tequilana* Weber variedad azul y de *Opuntia ficus indica* en pretratamientos químicos y enzimáticos para su aplicación en la producción de ácido succínico. In *Universidad Autonoma de Nuevo Leon*. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/18649>
- Babu, P., Chandel, A., & Singh, O. (2015). *Extremophiles and their applications in medical processes* (Issue October). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12808-5>
- Backer, R., Rokem, J., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bagur, M., Estepa, C., Martin, F., & Morales, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4>
- Bailey, K. (2014). The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens. In *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective* (Issue 1977). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00014-2>
- Becquer, C. (2022). Rhizobacteria and their contribution to plant tolerance to drought and salinity. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 56(2), 1–19. <https://doi.org/https://orcid.org/0000-0002-5738-7838>

- Benjumeda, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. In *Universidad de Sevilla*. <http://hdl.handle.net/11441/65140>
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Camelo, M., Vera, S., & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945031010%0ACómo>
- Canavarro, A., Machado, S., & Machado, B. (2002). Sideróforos: una respuesta dos microorganismos. *Química Nova*, 25(6b), 1155–1164. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000700016>
- Canchignia, F., Barrera, A., Canchignia, G., Morante, J., Peñafiel, M., & Cruz, N. (2015). Aplicación de rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas* spp como controladores biológicos de insectos y nematodos-plagas. *Ciencia y Tecnología*, 8(1), 25. <https://doi.org/10.18779/cyt.v8i1.197>
- Cesa, C., Baez, A., Quintero, V., De La Cruz, J., Castañeda, M. D., & Muñoz, J. (2020). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biologica Colombiana*, 25(1), 140–154. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>
- Chialva, J., & Griffa, F. (2020). *Producción biotecnológica de ácido succínico*. <http://hdl.handle.net/20.500.12272/5794>

- Cornejo, L. (2009). Recursos hídricos y desarrollo socioeconómico en zonas áridas: Importancia y perspectivas de nuevas tecnologías aplicadas al tratamiento de aguas naturales y/o residuales. *Ingeniare*, 17(3), 285–287. <https://doi.org/10.4067/s0718-33052009000300001>
- Diaz, M., Bell, A., Altuna, B., Gonzalez, M., Garcia, R., Paredes, E., Gallardo, R., Torres, E., & Carbonero, M. (2005). Influencia del pH y la temperatura en la producción de las fitotoxina producida por la *Pseudomonas aeruginosa* pss. Evaluacion de su efectividad en el control de maleza. *Fitosanidad*, 9(Septiembre), 41–48. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116189008.pdf>
- Dos Santos, A. (2007). Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. In *Universidad Autonoma de Barcelona* (Vol. 1). <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/ajse1de1.pdf>
- Durvasula, R., & Subba, D. (2018). Extremophiles from biology to biotechnology. In *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/9781315154695-7>
- Ehmann, A. (1977). The van URK-Salkowski reagent a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography A*, 132(2), 267–276. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)89300-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)89300-0)

- Esquivel, R., Gavilanes, M., Cruz, R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en Rizobacterias, una revisión. *Rev. Fitotec. Mex.*, *36*(3), 251–258. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300010
- Frank, J., Reich, C., Sharma, S., Weisbaum, J., Wilson, B., & Olsen, G. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(8), 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Gaete, A., Andreani, C., Maldonado, J., Muñoz, P., Sepulveda, G., & Gonzales, M. (2022). Bioprospecting of plant growth promoting traits of *Pseudomonas* sp. strain C3 isolated from the Atacama Desert: Molecular and culture based analysis. *Diversity*, *14*(388), 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/d14050388>
- Gaete, A., Mandakovic, D., & González, M. (2020). Isolation and identification of soil bacteria from extreme environments of Chile and their plant beneficial characteristics. *Microorganisms*, *8*(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081213>
- Garces, E., Valencia, H., Orozco, M., & Bautista, G. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, *6*(1), 19. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462/pdf>
- Glick, B. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(2), 109–117. <https://doi.org/10.1139/m95-015>

- Glick, B., Penrose, D., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, *190*(1), 63–68. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>
- Harding, D., & Raizada, M. (2015). Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: A review. *Frontiers in Plant Science*, *6*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00659>
- Huanca, W., Rivera, D., & Maita, J. (2015). A simple, fast, and inexpensive CTAB-PVP-silica based method for genomic DNA isolation from single, small insect larvae and pupae. *Genetics and Molecular Research*, *14*(3), 8001–8007. <https://doi.org/10.4238/2015.July.17.8>
- Karimi, K., Amini, J., Harighi, B., & Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Australian Journal of Crop Science*, *6*(4), 695–703. <https://www.researchgate.net/publication/285015325>
- Kundan, R., Pant, G., Jadon, N., & Agrawal, P. K. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, *06*(02). <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000155>
- Lagos, L. (2016). Hidrogeoquímica de fuentes termales en ambientes salinos relacionados con salares en los Andes del norte de Chile. *MSc Thesis*, 298. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/140833>

- Lahsen, A. (1976). La actividad geotermal y sus relaciones con la tectonica y el volcanismo en el norte de Chile. *Primer Congreso Geologico Chileno*. <https://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/20.500.13082/23954/28833.pdf?sequence=1>
- Lentzen, G., & Schwarz, T. (2006). Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(4), 623–634. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0553-9>
- Maier, A., Riedlinger, J., Fiedler, H., & Hampp, R. (2004). Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi in dual culture. *Mycological Progress*, 3(May), 129–136. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s11557-006-0083-y>
- Mandal, A., Sarkar, B., Mandal, S., Vithanage, M., Patra, A., & Manna, M. (2020). Impact of agrochemicals on soil health. In *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation: Pesticides and Chemical Fertilizers*. LTD. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00007-6>
- Márquez, M., Huerta, F., Sánchez, I., Segura, A., Avila, C., & Noriega, B. (2022). Análisis de la diversidad de microorganismos aislados de Zonas Geotérmicas. *Universidad de Guanajuato. Dirección de Apoyo a La Investigación y Al Posgrado*, 16, 1–12. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/7396>
- Martinez, R. (1990). *Malezas : Descripcion Y Control*. 28. https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_manual_citricultura_cap9.pdf

- Mehta, D., & Satyanarayana, T. (2013). Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: Biotechnology of thermophiles. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5>
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Moreno, A., García, V., Reyes, J., Vásquez, J., & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Muñoz, P. (2018). Microorganismos como una alternativa al uso de agroquímicos. *Idesia (Arica)*, 36(1), 3–5. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292018000100003>
- Muñoz, P., Cardenas, S., Arismendi, M., Huanacuni, N., Huanca, W., Cifuentes, D., & Sepulveda, G. (2021). The Endophytic *Pseudomonas* sp. S57 for Plant-Growth Promotion and the biocontrol of phytopathogenic fungi and nematodes. *Plants*, 10(Jul), 1531. <https://doi.org/10.3390/plants10081531>
- Muñoz, P., Márquez, S., González, F., Márquez, V., & Blamey, J. (2017). Structure and application of antifreeze proteins from Antarctic bacteria. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0737-2>

- Muñoz, P., Marquez, S., Sepulveda, G., Cardenas, S., Arismendi, M., Huanca, W., Aguilar, Y., Quezada, A., & Bugueño, F. (2023). Isolation and Identification of Bacteria from Three Geothermal Sites of the Atacama Desert and their Plant-Beneficial Characteristics. *Microorganisms*, 11(2635). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112635>
- Norambuena, H. (1995). *El control biologico de las malezas*. Biblioteca Digital INIA. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/35808>
- Oficina de estudio y políticas agrarias (ODEPA). (2020). *Región de Arica y Parinacota: Información regional 2020*. <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2020/06/Arica-y-Parinacota-.pdf>
- Osorio, N. (2009). Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. *En Sociedad Colombiana de La Ciencia Del Suelo & Centro Nacional de Investigaciones de Café (Eds.)*, 43–71. https://doi.org/10.38141/10791/0003_3
- Pacheco, X., Rodríguez, A., González, R., Amora, E., Guerrero, L., & Rodríguez, A. (2015). Evaluación del efecto fitotóxico de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta* (Moench). *Polibotánica*, 0(40), 137–152. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.9>
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17, 362-370. <https://doi.org/https://cir.nii.ac.jp/crid/1570572700155945472>

- Qin, Y., Druzhinina, I., Pan, X., & Yuan, Z. (2016). Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1245–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., & Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7907–7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>
- Ramirez, H. (2017). *Producción de celulasas bacterianas termoestables utilizando papel periodico reciclado como sustrato* [Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann]. <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/1966>
- Ramírez, N., Serrano, J., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56–71. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>
- Rathore, A., & Gupta, R. (2015). Chitin Bacteria To Human. *Enzyme Research*, 2015(791907), 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/791907>
- Ren, H., Zentek, J., & Vahjen, W. (2019). Optimization of production parameters for probiotic *Lactobacillus* strains as feed additive. *Molecules*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183286>
- Reyes, A., Gerding, M., Oyarzúa, P., Zagal, E., Gerding, J., & Fischer, S. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria able to improve NPK availability: Selection, identification and effects on tomato growth. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(3), 473–485. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000300473>

- Rodriguez, E. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(4), 990–991. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.44.4.990-991.1982>
- Roychowdhury, R., Qaiser, T., Mukherjee, P., & Roy, M. (2019). Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain PGP for Plant Growth Promotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 89(1), 353–360. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0946-9>
- Santoyo, G., Valencia, E., Orozco, M., José, J., & Rodolfo, P. (2010). Papel de los sideroforos en la actividad antagonica de *Pseudomonas fluorescens* Zumbo hacia hongos fitopatogenos. *Terra Latinoamericana* (1998), 28(1), 53–60. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792010000100006&lng=es&tlng=es
- Schippers, B., Bakker, A., Bakker, P., & Van Peer, R. (1990). Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, 129(1), 75–83. <https://doi.org/10.1007/BF00011693>
- Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sepúlveda, G., Macuer, M., & Muñoz, P. (2020). Endospore-forming bacteria present in a commercial stabilized poultry manure determines the *Fusarium* biocontrol and the tomato growth promotion. *Agronomy*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/agronomy10111636>

- Shilev, S. (2020). Plant-growth-promoting bacteria mitigating soil salinity stress in plants. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(20), 1–20. <https://doi.org/10.3390/app10207326>
- Slifkin, M. (2000). Tween 80 opacity test responses of various candida species. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4626–4628. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.12.4626-4628.2000>
- Sorty, A., Bitla, U., Meena, K., & Singh, N. (2018). Role of microorganisms in alleviating abiotic stresses. *Microorganisms for Green Revolution, 2*(Microbes for Sustainable Agro-ecosystem), 115–128. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7146-1_6
- Starobinsky, G., Monzón, J., Di Marzo Broggi, E., & Braude, H. (2021). Bioinsumos para la agricultura que demandan esfuerzos de investigación y desarrollo Capacidades existentes y estrategia de política pública para impulsar su desarrollo en Argentina. *Documentos de Trabajo Del CCE (17)*., 1–137. http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/3650/1/S2009064_es.pdf%0Ahttp://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Biodesint.pdf
- Tangarife, N. (2021). Control biológico, la nueva era de la agricultura. *Industry and Higher Education*, 3(1), 1689–1699. <http://journal.unilak.ac.id/index.php/JIEB/article/view/3845%0Ahttp://dspace.uc.ac.id/handle/123456789/1288>
- Torres, A., & Acevedo, E. (2008). El problema de salinidad en los recursos suelo y agua que afectan el riego y cultivos en los valles de Lluta y Azapa en el Norte de Chile. *Idesia*, 26(3), 31–44. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292008000300004>

- Trujillo, P. (1974). Seminario sobre los recursos energeticos. Catastro de Recursos Geotérmicos de Chile. *Comision Nacional de Investigacion Cientifica y Tecnologia, CONICYT*, 16–19. <https://bibliotecadigital.ciren.cl/server/api/core/bitstreams/668014f1-851f-41a3-aabe-61457df7d87f/content>
- Tsavkelova, E., Klimova, S., Cherdyntseva, T., & Netrusov, A. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use : A Review. *Appl. Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 133–143. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>
- Uzair, B., Kausar, R., Bano, S. A., Fatima, S., Badshah, M., Habiba, U., & Fasim, F. (2018). Isolation and Molecular Characterization of a Model Antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* Divulging *in Vitro* Plant Growth Promoting Characteristics. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6147380>
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*, 21(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Velásquez, A., Quintero, M., Jiménez, E., Blandón, L., & Gómez, J. (2018). Microorganismos marinos extremófilos con potencial en bioprospección. In *Revista de la Facultad de Ciencias* (Vol. 7, Issue 2, pp. 9–43). <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v7n2.67360>
- Verma, K., & Garg, N. (2019). Detection of Chitinase on Chitin Agar Plates. *International Journal of Science and Research*, 8(2), 1186–1189. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>

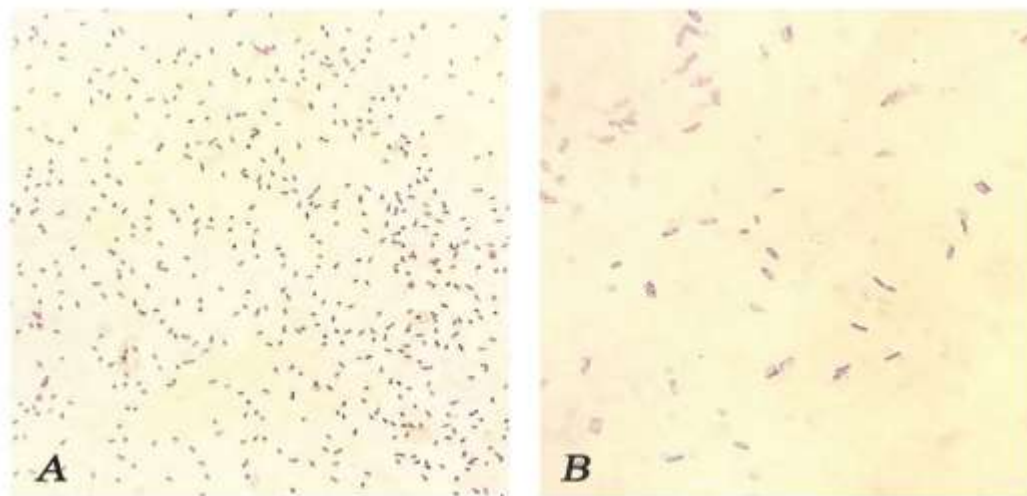
- Vijayaraghavan, P., & Vincent, S. (2013). A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. *Journal of Biochemical*, 4(3), 628–630. <http://jbiochemtech.com/index.php/jbt/article/viewArticle/jbt419>
- Villegas, J., Reyes, J., Nieto, A., Ruiz, F., Cruz, A., & Murillo, B. (2018). Bioestimulante Liplant®: su efecto en *Solanum lycopersicum* (L.) cultivado en suelos ligeramente salinos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 30(20), 4137–4147. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.985>
- Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D., Nickel, P., & Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18), 7745–7766. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>
- Yang, J., Cao, H., Wang, W., Zhang, L. hui, & Dong, J. gao. (2014). Isolation, identification, and herbicidal activity of metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* CB-4. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(8), 1719–1726. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60695-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60695-4)

Continuación del anexo 1

	Código trabajo	Afiliación	% Identidad	%GC	Longitud	Proteasa	Lipasa	Quitinasa	Celulasa	Amilasa	Auxinas	Sideróforos	Fijación N2	Solubilización P	Botrytis	Fusarium	Alternaria	Trichoderma	Geotrichum	Phytium	Macrophomina	Montinia
Termas de Polloquere	TP3	<i>Bacillus velezensis</i> NR_116240.1	96	55	1453	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP4	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99	55	1357	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	TP7	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99	55	1386	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	TP8	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99	55	1362	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP9	<i>Aeromonas veronii</i> NR_118947.1	99	56	1408	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP10	<i>Aeromonas veronii</i> NR_119045.1	85,5	52	1100	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP12	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99	55	1360	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP14	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99	55	1356	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	TP15	<i>Enterobacter ludwigii</i> NR_042349.1	99	55	1360	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	TP17	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99,6	55	1406	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP19	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	67,9	56	1321	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP20	<i>Escherichia fergusonii</i> NR_074902.1	91,9	55	1399	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP22	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> NR_026075.1	66,3	53	1280	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP23	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99,8	55	1384	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
	TP30	<i>Atlantibacter hermannii</i> NR_104940.1	68,8	56	1321	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP31	<i>Escherichia fergusonii</i> NR_074902.1	99,2	55	1384	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP32	<i>Aeromonas veronii</i> NR_119045.1	89,6	54	1100	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP33	<i>Aeromonas veronii</i> NR_119045.1	92,1	54	1100	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP34	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99,8	55	1405	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
	TP35	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99,7	55	1384	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	TP36	<i>Escherichia fergusonii</i> NR_074902.1	99,6	55	1356	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	TP38	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99,7	55	1358	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
TP42	<i>Pantoea agglomerans</i> NR_111998.1	99,8	55	1358	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	

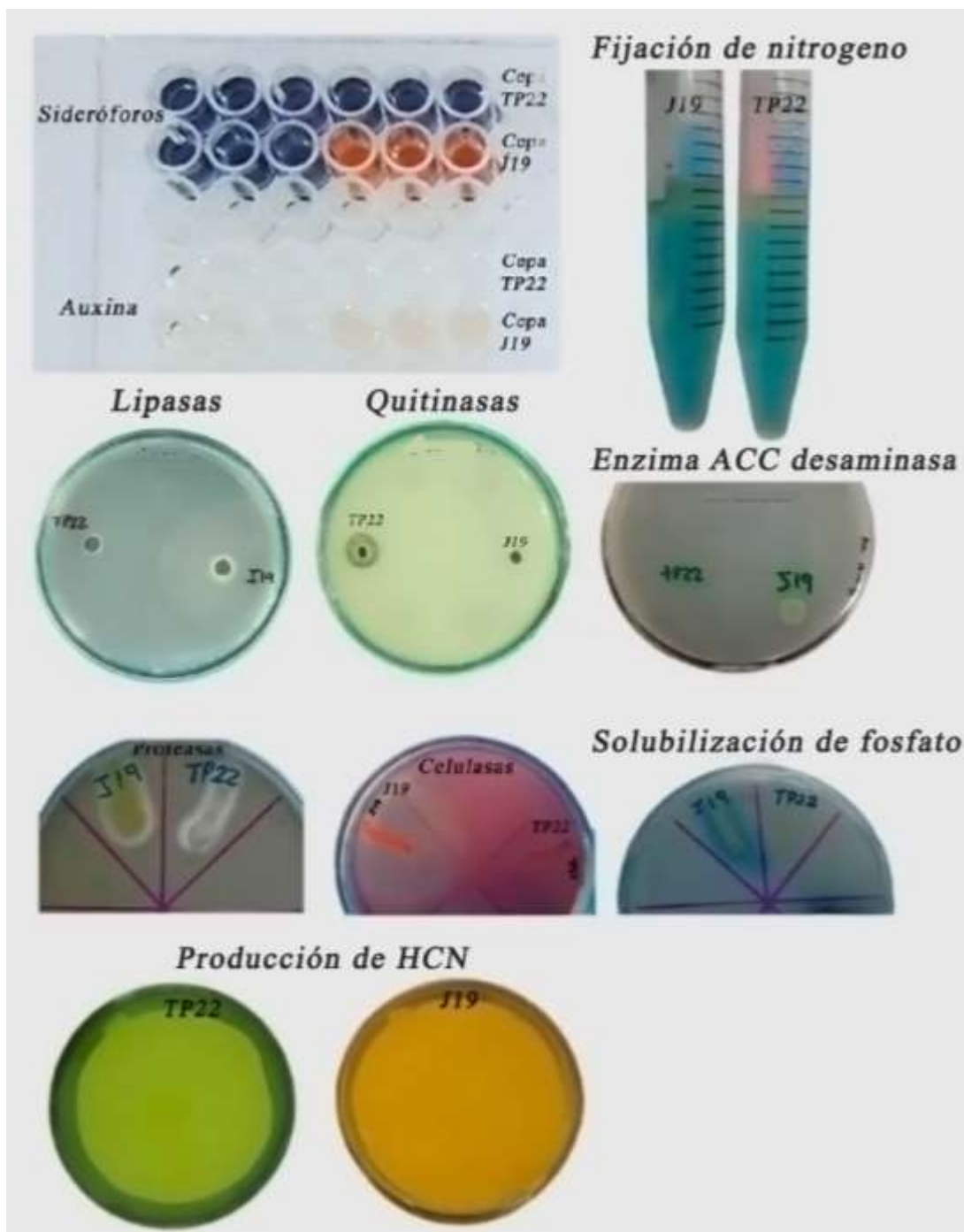
ANEXO 2

Fotografías de la tinción Gram de *P. aeruginosa* cepa J19 (A) y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 (B) con potencial PGP



ANEXO 3

Fotografías de los resultados de pruebas funcionales de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22



ANEXO 4

Datos crudo de tolerancia a NaCl y H₃BO₃ de *P. aeruginosa* cepa J19 y *A. succiniciproducens* cepa TP22

	Cepa J19			Cepa TP22		
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 1	N° 2	N° 3
Control	0,713	0,818	0,74	1,218	1,243	1,215
8 g/L NaCl	0,788	0,695	0,785	1,048	0,997	1,022
15 g/L NaCl	0,624	0,655	0,770	0,929	1,025	0,994
30 g/L NaCl	0,538	0,480	0,428	0,419	0,416	0,428
10 ppm H₃BO₃	0,559	0,682	0,617	0,904	0,849	0,829
100 ppm H₃BO₃	0,553	0,568	0,564	0,808	0,885	0,786
300 ppm H₃BO₃	0,589	0,547	0,592	0,811	0,796	0,833
Agua de río Lluta	0,319	0,320	0,362	0,749	0,728	0,734
1X agua de Lluta	1,076	0,657	0,759	1,419	1,676	1,465
2X agua de Lluta	0,857	0,998	0,821	1,477	1,67	1,501
4X agua de Lluta	0,788	0,738	0,912	1,393	1,422	1,676
8X agua de Lluta	0,732	0,775	0,735	1,485	1,464	1,468

ANEXO 5

Valores de absorbancia a 600 nm para obtener las condiciones óptimas para el crecimiento de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22

		Parámetro: Agitación										
	Tiempo	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cepa J19	0 rpm	0,036	0,052	0,062	0,095	0,107	0,142	0,167	0,206	0,229	0,245	
	50 rpm	0,058	0,103	0,139	0,200	0,232	0,299	0,365	0,401	0,439	0,461	
	100 rpm	0,065	0,135	0,308	0,459	0,615	0,718	0,848	0,976	1,022	1,064	
	150 rpm	0,032	0,065	0,178	0,403	0,663	0,818	0,886	0,986			
	200 rpm	0,031	0,087	0,225	0,523	0,880	0,998	1,144	1,110			
Cepa TP22	0 rpm	0,005	0,000	0,000	0,006	0,001	0,015	0,037	0,118	0,129	0,155	0,190
	50 rpm	0,010	0,000	0,000	0,008	0,020	0,094	0,144	0,187	0,244	0,258	0,255
	100 rpm	0,011	0,000	0,000	0,010	0,021	0,105	0,286	0,565	0,670	0,842	0,948
	150 rpm	0,008	0,020	0,047	0,172	0,377	0,593	0,984	1,212			
	200 rpm	0,030	0,032	0,059	0,209	0,407	0,661	1,168	1,180			

		Parámetro: Temperatura									
	Tiempo	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Cepa J19	T° Ambiente	0,000	0,014	0,022	0,028	0,041	0,040	0,108	0,138	0,180	
	30°C	0,029	0,000	0,000	0,111	0,238	0,452	0,664	0,788	0,830	
	35°C	0,025	0,027	0,000	0,366	0,535	0,640	0,804	0,856	0,922	
	40°C	0,000	0,000	0,037	0,144	0,392	0,592	0,786	0,834	0,886	
Cepa TP22	T° Ambiente	0,000	0,005	0,000	0,017	0,028	0,030	0,062	0,076	0,097	
	30°C	0,037	0,012	0,000	0,020	0,060	0,152	0,388	0,615	1,038	
	35°C	0,002	0,000	0,000	0,096	0,318	0,510	0,960	1,244	1,54	
	40°C	0,000	0,094	0,054	0,221	0,404	0,614	0,948	1,120	1,230	

Continuación del anexo 5

	Tiempo	Parámetro: pH								
		5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Cepa J19	2	0,000	0,018	0,034	0,011	0,000	0,000	0,018	-	-
	3	0,000	0,005	0,006	0,000	0,003	0,009	0,002	-	-
	4	0,010	0,018	0,039	0,025	0,015	0,031	0,039	-	-
	5	0,008	0,056	0,092	0,088	0,060	0,082	0,084	-	-
	6	0,012	0,123	0,170	0,242	0,162	0,204	0,196	-	-
	7	0,031	0,343	0,433	0,503	0,450	0,483	0,483	-	-
	8	0,069	0,539	0,597	0,641	0,606	0,642	0,631	-	-
	9	0,159	0,668	0,690	0,713	0,668	0,698	0,696	-	-
	Cepa TP22	2	0,000	0,000	0,000	0,010	0,061	0,0105	0,0115	0,016
3		0,000	0,000	0,000	0,021	0,025	0,0265	0,028	0,054	0,044
4		0,012	0,004	0,077	0,159	0,119	0,1235	0,123	0,134	0,116
5		0,000	0,000	0,290	0,342	0,312	0,3085	0,2845	0,291	0,25
6		0,000	0,000	0,514	0,569	0,566	0,5615	0,5075	0,385	0,289
7		0,009	0,000	0,690	0,699	0,814	0,908	0,7835	0,82	0,496
8		0,000	0,000	0,972	0,942	0,970	1,146	1,072	1,054	0,764
9		0,013	0,000	1,114	1,078	1,224	1,279	1,282	1,252	0,976
10		0,000	0,000	0,000	0,010	0,061	0,0105	0,0115	0,016	0,028

ANEXO 6

Valores de absorbancia a 600 nm para la curva de crecimiento de *P. aeruginosa* cepa J19
y de *A. succiniciproducens* cepa TP22

Tiempo (hora)	J19		TP22	
	Óptimo	Inicial	Óptimo	Inicial
0	0,071	0,055	0,000	0,000
1	0,060	0,082	0,003	0,000
2	0,084	0,070	0,017	0,000
3	0,210	0,084	0,098	0,000
4	0,475	0,111	0,336	0,020
5	0,665	0,109	0,678	0,022
6	1,126	0,120	1,172	0,055
7	1,252	0,114	1,458	0,083
8	1,332	0,109	1,990	0,091
9	1,706	0,149	2,060	0,107
10	2,140	0,158	2,180	0,096
11	2,200	0,171	2,790	0,186
12	2,220	0,188	2,530	0,152

ANEXO 7

Valores media de la altura de la planta de maíz “Lluteño” y número de hojas durante el mes de evaluación de actividad promotora del crecimiento vegetal

DÍA	Altura de la planta (cm.)			
	Agua	BacNorte	J19	TP22
0	9,3 ± 2,7	6,4 ± 1,9	9,3 ± 1,6	9,8 ± 2,0
5	34,2 ± 4,7	33,3 ± 5,0	41,9 ± 3,7	40,6 ± 4,5
8	43,6 ± 6,0	43,3 ± 5,8	52,2 ± 4,3	49,8 ± 4,9
12	69,7 ± 8,8	70,2 ± 7,1	75,5 ± 7,4	74,5 ± 6,1
15	82,8 ± 9,6	80,1 ± 7,8	85,5 ± 5,5	83,3 ± 11,1
19	111,3 ± 12,7	108,7 ± 10,0	111,7 ± 11,2	109,5 ± 14,4
22	116,0 ± 13,0	113,0 ± 7,8	116,9 ± 10,5	113,4 ± 14,9
26	134,4 ± 11,8	136,7 ± 11,3	137,7 ± 14,9	132,8 ± 17,2
29	148,5 ± 13,2	147,4 ± 11,3	149,8 ± 17,0	143,9 ± 19,7
33	172,5 ± 14,7	169,2 ± 16,2	174,4 ± 24,4	170,4 ± 25,6

Continuación Anexo 7

DÍA	Número de hojas			
	Agua	BacNorte	J19	TP22
0	2,0 ± 0,5	1,5 ± 0,5	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,4
5	3,9 ± 0,34	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,3	4,0 ± 0,4
8	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,7 ± 0,5	4,4 ± 0,5
12	5,9 ± 0,5	5,8 ± 0,4	6,3 ± 0,5	6,1 ± 0,7
15	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,6 ± 0,6	6,8 ± 0,4
19	8,1 ± 0,6	8,3 ± 0,6	8,6 ± 0,6	8,4 ± 0,9
22	8,3 ± 0,6	8,6 ± 0,7	9,1 ± 0,8	9,1 ± 0,7
26	9,6 ± 0,6	9,3 ± 0,7	10,2 ± 0,9	10,1 ± 0,7
29	9,9 ± 0,6	9,7 ± 0,6	10,3 ± 0,8	10,2 ± 0,9
33	10,5 ± 0,7	10,1 ± 0,8	11,2 ± 0,9	11,1 ± 1,4

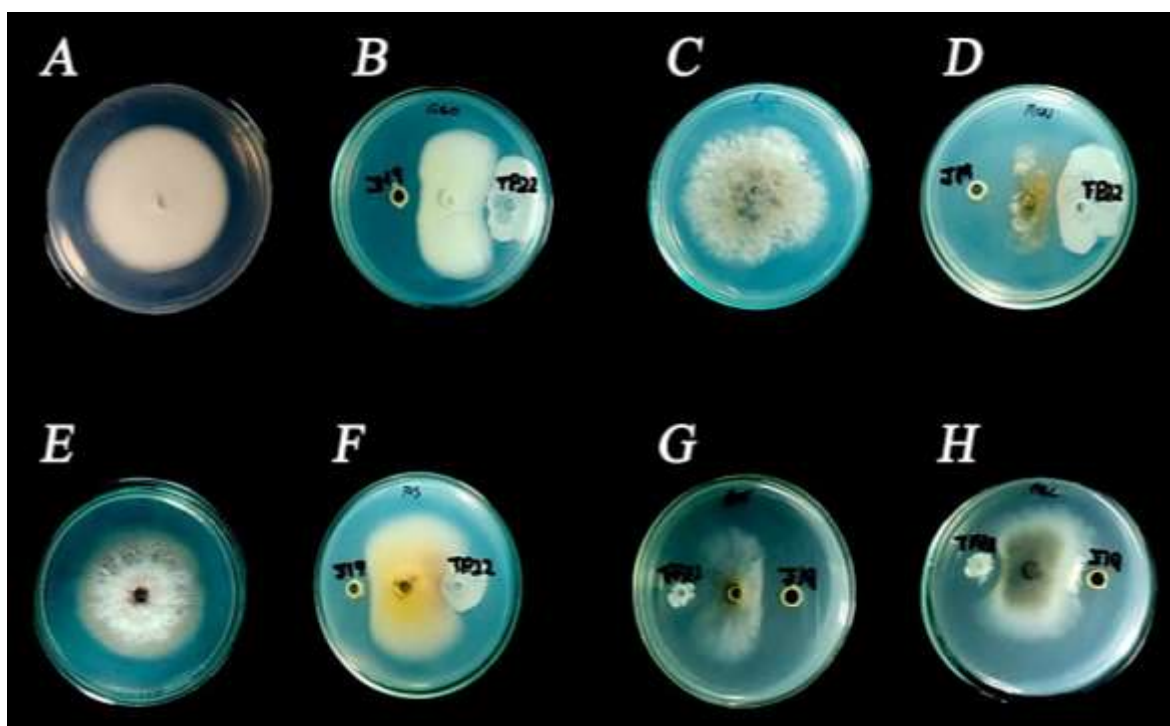
ANEXO 8

Valores peso fresco y seco de las plantas de maíz "Lluteño" tratadas con cepas J19 y TP22

N°	Peso fresco de maíz "Lluteño"				Peso seco de maíz "Lluteño"			
	Cepa J19	Cepa TP22	BacNorte	Control	Cepa J19	Cepa TP22	BacNorte	Control
1	316	272	268	320	48,05	46,03	38,64	41,32
2	384	306	228	264	44,88	45,43	35,8	36,59
3	300	254	230	312	39,86	31,08	36,61	42,12
4	202	272	224	178	32,7	38,88	34,31	29,94
5	188	254	284	310	26,73	40,05	37,34	39,25
6	274	286	274	304	36,91	35,74	36,84	42,45
7	280	244	264	244	36,54	34,96	35,21	35,09
8	232	136	258	276	35,28	24,11	35,91	36,27
9	242	256	230	256	33,55	35,67	30,96	34,72
10	278	218	224	242	38,36	29,86	32,56	34,49
11	224	254	266	288	38,9	26,05	32,81	36,75
12	272	272	234	264	39,03	36,84	32,24	37,25
13	290	236	172	250	36,31	37,24	28,54	38,14
14	264	224	200	244	33,27	34,56	33,01	38,88
15	252	224	196	216	36,08	33,31	31,56	36,61

ANEXO 9

Fotografías de la actividad biocontroladora de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 contra *Geotrichum candidum* (A, B); *Monilinia fructicola* (C, D); *Fusarium oxysporum* (E, F); *Botrytis cinerea* (G) y *Macrophomina phaseolina* (H).



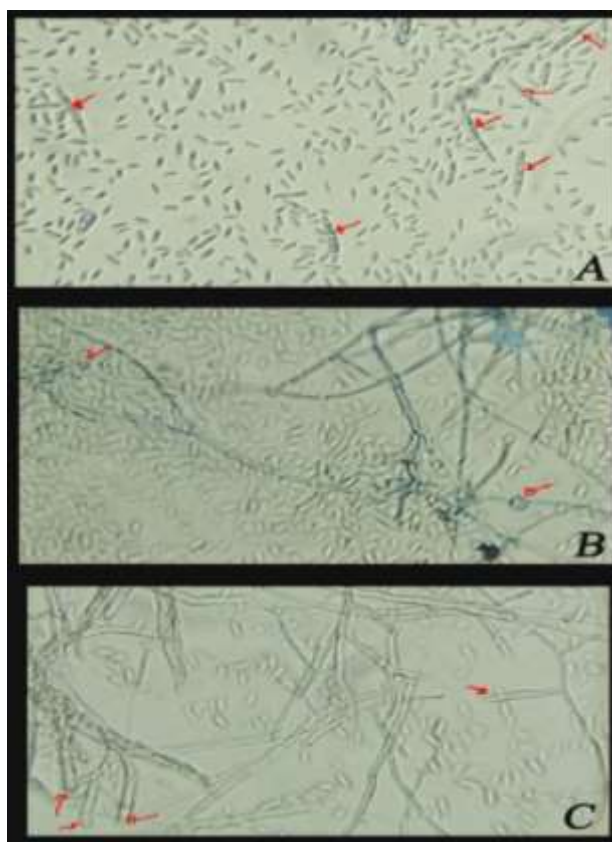
ANEXO 10

Peso fresco de maíz variedad GSS3951 infectadas con *Fusarium oxysporum*.

N°	Control	Serenade	Cepa J19	Cepa TP22
1	117,69	101,75	131,96	134,1
2	90,12	119,57	69,76	162,24
3	116,48	110,73	88,8	114,67

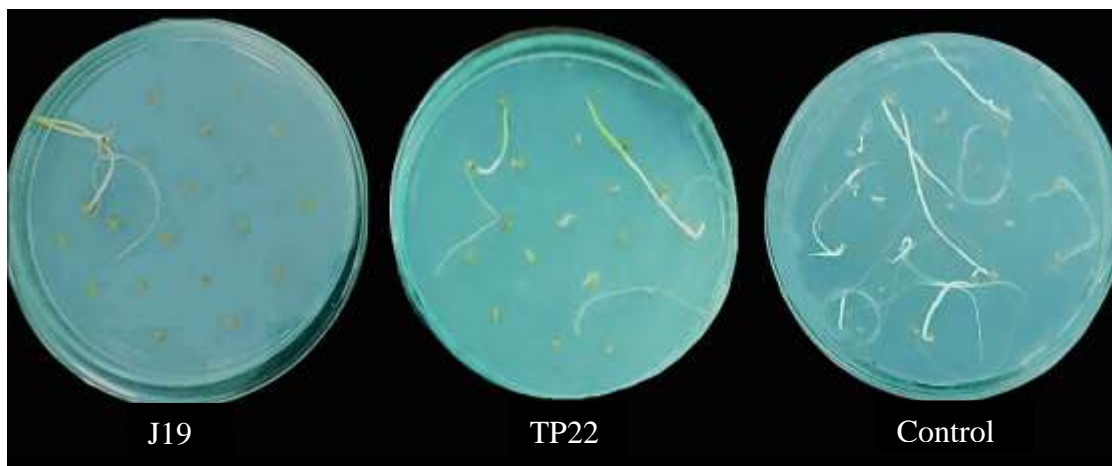
ANEXO 11

Fotografías microscópicas de *Fusarium oxysporum* (reaislamiento) a partir de plantas de maíz variedad GSS3951 infectadas. A. Microconidias y macroconidias (flechas rojas). B. Clamidospora. C. Fiálides



ANEXO 12

Fotografías de los resultados de la actividad biocontroladora de *Pseudomonas aeruginosa* cepa J19 y de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* cepa TP22 contra *Cenchrus echinatus*



ANEXO 13

Datos crudos de los resultados de la actividad biocontroladora de *P. aeruginosa* cepa J19 y de *A. succiniciproducens* cepa TP22 contra

Cenchrus echinatus

Longitud de la radícula de <i>C. echinatus</i>								Germinación de <i>C. echinatus</i>							
N°	Control	Cepa J19	Cepa TP22	N°	Control	Cepa J19	Cepa TP22	N°	Control	Cepa J19	Cepa TP22	N°	Control	Cepa J19	Cepa TP22
1	124	35	34	31	3	0	0	1	1	1	1	31	1	0	0
2	106	7	20	32	83	0	0	2	1	1	1	32	1	0	0
3	109	2	6	33	71	0	0	3	1	1	1	33	1	0	0
4	87	3	34	34	4	0	0	4	1	1	1	34	1	0	0
5	68	2	2	35	4	0	0	5	1	1	1	35	1	0	0
6	49	34	2	36	4	0	0	6	1	1	1	36	1	0	0
7	37	5	78	37	49	0	0	7	1	1	1	37	1	0	0
8	13	3	20	38	37	0	0	8	1	1	1	38	1	0	0
9	6	3	3	39	4	0	0	9	1	1	1	39	1	0	0
10	2	64	2	40	6	0	0	10	1	1	1	40	1	0	0
11	2	23	2	41	2	0	0	11	1	1	1	41	1	0	0
12	14	2	6	42	0	0	0	12	1	1	1	42	0	0	0
13	15	0	4	43	0	0	0	13	1	0	1	43	0	0	0
14	34	0	3	44	0	0	0	14	1	0	1	44	0	0	0
15	76	0	3	45	0	0	0	15	1	0	1	45	0	0	0
16	91	0	113	46	0	0	0	16	1	0	1	46	0	0	0
17	2	0	51	47	0	0	0	17	1	0	1	47	0	0	0
18	97	0	3	48	0	0	0	18	1	0	1	48	0	0	0
19	3	0	2	49	0	0	0	19	1	0	1	49	0	0	0
20	3	0	7	50	0	0	0	20	1	0	1	50	0	0	0
21	2	0	3	51	0	0	0	21	1	0	1	51	0	0	0
22	2	0	6	52	0	0	0	22	1	0	1	52	0	0	0
23	2	0	8	53	0	0	0	23	1	0	1	53	0	0	0
24	62	0	3	54	0	0	0	24	1	0	1	54	0	0	0
25	23	0	6	55	0	0	0	25	1	0	1	55	0	0	0
26	19	0	4	56	0	0	0	26	1	0	1	56	0	0	0
27	4	0	3	57	0	0	0	27	1	0	1	57	0	0	0
28	2	0	3	58	0	0	0	28	1	0	1	58	0	0	0
29	2	0	0	59	0	0	0	29	1	0	0	59	0	0	0
30	6	0	0	60	0	0	0	30	1	0	0	60	0	0	0

ANEXO 14

Medios de cultivos utilizados en el presente estudio

Medio King's B (1L)	
Peptona	20 g
Glicerol	11,4 mL
MnSO ₄	1,5 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
Agar	15 g

Medio Caldo Nutritivo modificado (1L)	
Peptona de caseína	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agar	15 g

Continuación del anexo 14

Medio O/F (1L)	
NaCl	5 g
Triptona	2 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	2 g

Se distribuye 4,5 mL de medio a tubos y se agrega 500 µL de la fuente de carbono.

Fuente de carbono (volumen final 50 mL para cada uno)			
L-Asparagina	5 g	D-Rafinosa	5 g
D-Glucosa	5 g	D-Manitol	5 g
D-Galactosa	5 g	D-Sorbitol	5 g
D-Celobiosa	5 g	D-Inositol	5 g
D-Melibiosa	5 g	Lactosa	5 g
D-Fructosa	5 g	Sacarosa	5 g
D-Ramnososa	5 g		

ANEXO 15

Medios y reactivos para la caracterización funcional de las bacterias

Producción de auxina

Reactivo de Salkowski (1L)	
FeCl ₃ (0,5M)	1 g/ L
HClO ₄ (35%)	50 g/ L

Producción de proteasas

Agar leche descremada (L)	
Leche descremada	28 g
Hidrolizado de caseína	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g

Fijación de nitrógeno

Medio semisólido NFb (1L)			
Ácido málico	5 g	Mezcla de azul de bromotimol	2 mL
K ₂ HPO ₄	0,5 g	Agar (Semisólido)	1,8 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2 g	Solución de micronutrientes	2 mL
NaCl	0,1 g	Fe EDTA al 1,64%	4 mL
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,02 g	Solución de vitaminas	1 mL

Mezcla de azul de bromotimol (volumen final 50 mL)	
KOH	0,225 g
Azul de bromotimol	0,25 g

Solución de vitaminas (1L)	
Biotina	100 mg
Pyridoxal HCl	200 mg

Solución de micronutrientes (1L)			
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,04 g	H ₃ BO ₃	1,4 g
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1 g	MnSO ₄ * H ₂ O	1,175 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,12 g		

Solubilización de fosfato

Medio Pikovskaya (PVK) para 1L

Extracto de levadura	0,5 g
Glucosa	10 g
Fosfato de Calcio	5 g
Sulfato de amônio	0,5 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,2 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g
Stock MnSO ₄ + FeSO ₄	0,1 g
Agar	15 g

Stock MnSO₄ + FeSO₄

MnSO ₄ y	1 g/ L
FeSO ₄	1 g/ L

Producción de quitinasas

Agar quitina coloidal (1L)

Quitina coloidal (quitina + HCl)	1 L	K ₂ HPO ₄	1,36 g
Extracto de levadura	0,5 g	Agar	15 g
MnSO ₄	1 g	pH	7

Producción de celulasas

Agar CMC (1L)	
CMC	10 g
Peptona	1 g
Urea	0,3 g
K ₂ HPO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
CaCl ₂	0,3 g
MnSO ₄	0,3 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,014 g
CoCl ₂	0,002 g
FeSO ₄	0,05 g
MnSO ₄	0,016 g
Agar	15 g
