

## Cepas bacterianas nativas con actividades promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizosfera de *Coffea* spp. en Pichanaqui, Perú

Mario Alcarraz Curi<sup>1\*</sup>, Vidalina Heredia Jiménez<sup>2</sup>, Jean Paul Julian Ibarra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioprocesos Industriales, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Calle Germán Amézaga N° 375. Ciudad Universitaria. Lima 1. Perú.

<sup>2</sup>Laboratorio de Química de los Alimentos, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Calle Germán Amézaga N° 375. Ciudad Universitaria. Lima 1. Perú.

\*Autor para correspondencia: e-mail: biomac\_20@hotmail.com

### RESUMEN

El deterioro del suelo y la demanda de café orgánico, hace necesario la búsqueda de alternativas para mejorar su productividad y calidad, por lo que el objetivo de la investigación fue seleccionar cepas bacterianas nativas de la rizosfera de plantas de café con actividad *in vitro* de promoción del crecimiento vegetal. Se aislaron bacterias a partir de la rizosfera de cultivos cafetaleros del distrito de Pichanaqui, Provincia de Chanchamayo, Junín, Perú. De las cepas obtenidas se determinó *in vitro* la actividad promotora del crecimiento vegetal a través de ensayos de fijación de N<sub>2</sub> atmosférico, solubilización de fosfatos y producción de ácido indol acético. Las cepas de mejores resultados se identificaron molecularmente a través del gen 16S rRNA. Se seleccionaron 12 cepas bacterianas. Todas las cepas fijaron N<sub>2</sub> atmosférico, el 83.3% produjo AIA y el 75% solubilizó fosfatos. Se identificó la presencia de tres géneros: *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Varias de las cepas poseen más de una actividad de promoción del crecimiento vegetal. En especial *Azospirillum amazonense* 11 (fijación neta de nitrógeno 2.05 mg l<sup>-1</sup>, producción de AIA 66.03 µg m l<sup>-1</sup> y solubilización de fosfatos). Esto las convierte en potenciales biofertilizantes para el cultivo del café (*Coffea* spp.).

Palabras clave: ácido indol acético, fijación biológica de nitrógeno, PGPR, solubilización de fosfatos

## Native bacterial strains with plant growth promotion activities isolated from *Coffea* spp. rhizosphere in Pichanaqui, Perú

### ABSTRACT

The deterioration of the soil and the demand for organic coffee, makes it necessary to find alternatives to improve its productivity and quality, so the objective of the research was to select native bacterial strains from coffee plants rhizosphere with plant growth promotion activities. Bacteria were isolated from the rhizosphere of coffee crops in the Pichanaqui district, Chanchamayo Province, Junín, Peru. The plant growth promotion activities were *in vitro* determined for strains obtained through tests of atmospheric N<sub>2</sub> fixation, phosphate solubilization and indole acetic acid (IAA) production. The best-performing strains were molecularly identified through the 16S rRNA gene. Twelve bacterial strains were selected. All strains fixed atmospheric N<sub>2</sub>, 83.3% produced IAA and 75% solubilized phosphates. The presence of three genera was identified: *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Burkholderia*. Several strains have more than one activity to promote plant growth. Especially, *Azospirillum amazonense* 11 (net nitrogen fixation 2.05 mg l<sup>-1</sup>, 66.03 µg ml<sup>-1</sup> IAA production and phosphate solubilization). This makes them potential biofertilizers for the coffee crop (*Coffea* spp.).

Keywords: biological nitrogen fixation, indole acetic acid, PGPR, phosphates solubilization

## INTRODUCCIÓN

La agroexportación en Perú ha causado un gran dinamismo (Perú Opportunity Fund, 2011) y se ha consolidado como la segunda fuente de divisas (Minagri, 2018). Para Creus (2017) debido al creciente reconocimiento del papel que juegan los procesos biológicos en el funcionamiento del suelo y en la producción agrícola, se ha buscado contrarrestar el efecto de la rápida pérdida de la calidad ambiental, con la promoción de la denominada agricultura sostenible. En este contexto, es necesario el uso racional de fertilizantes sintéticos y una opción para su reemplazo son el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, donde se encuentran especies de hongos y bacterias.

En la rizosfera de las plantas están presentes microorganismos fijadores de  $N_2$  (diazotrofos) (Cárdenas *et al.*, 2010; Clavijo *et al.*, 2012; Caldwell *et al.*, 2015). De acuerdo con estudios realizados muchas de las bacterias fijadores de  $N_2$  presentan, además, diversos mecanismos que favorecen el desarrollo de plantas, lo que hace que sean consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, del inglés, *Plant Growth Promotion Rhizobacteria*) (Kumar y Rao, 2012). Un grupo de las PGPR más destacadas son las pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*, las cuales son bacterias de vida libre que constitutivamente poseen la cualidad de fijar  $N_2$  atmosférico (Kumar y Rao, 2012; Arjun *et al.*, 2015).

El uso de PGPR como biofertilizantes, tiene como objetivo una agricultura sostenible, estrategia que consta con una amplia aceptación mundial como uno de los métodos seguros para el control de plagas y la promoción del crecimiento de las plantas (Mhatre *et al.*, 2018).

Entre las bacterias más estudiadas y frecuentes en la rizosfera de *Coffea* spp. se encuentran especies de los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter* y *Pseudomonas* (Caldwell *et al.*, 2015). Se han descrito algunos mecanismos por los cuales estos microorganismos podrían inducir el crecimiento de las plantas, entre los que se mencionan la síntesis de hormonas, como por ejemplo las auxinas (ácido indol acético), citoquininas y ácido abscísico. También se incluye la solubilización de fosfatos, la fijación

de nitrógeno atmosférico y la síntesis de compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, como sideróforos, quitinasas, antibióticos, etc. (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Conociendo que la agricultura en Perú ha tomado impulso en los últimos años y dentro de ella el desarrollo cafetalero, el deterioro del suelo y la demanda de café orgánico, hace necesaria la búsqueda de alternativas para mejorar su productividad y calidad. Es preciso, además, el desarrollo de tecnologías amigables con el ambiente que puedan responder al crecimiento de la demanda de fertilizantes. Atendiendo a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar cepas bacterianas nativas de la rizosfera de plantas de cafeto con actividad *in vitro* de promoción del crecimiento vegetal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 500 g de muestras de suelo de la rizosfera (20 cm de profundidad aproximada) de plantas de cafeto (*Coffea* spp.) en cuatro fincas (Santa Rosa, Autiki, San Pedro y 28 de Julio) de Pichanaqui, departamento Junín (Perú) cuyas coordenadas geográficas son 10°55'25" S 74°53'44" O. El clima en la región se ha determinado como subtropical, semihúmedo y con precipitaciones anuales de aproximadamente 2200 mm y una temperatura promedio de 26 °C (Cuba e Ita, 2017). De acuerdo con la Leyenda de Suelos de FAO (1994), el tipo de suelos analizados son del Sub Grupo asociado Tipo Dystrudeptos-Tipo Udifluventes que se caracterizan por tener de 0 a 4% de pendiente, profundos, de textura franco arcilloso, de permeabilidad moderadamente lenta.

### *Aislamiento y caracterización*

Las muestras de suelo fueron pre-enriquecidas en caldo NFb modificado (5 g ácido málico, 0.5 g  $K_2HPO_4$ , 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1 g NaCl, 0.02 g  $CaCl_2$ , 4 ml Na-EDTA (1.64%, m/v) en un litro de agua) por 5 días a 28 °C. A partir de esta se realizaron diluciones seriadas en solución salina (0.85%, m/v) y seguidamente se inocularon por agotamiento (diluciones  $10^{-3}$ - $10^{-5}$ ) en placas de Petri que contenían medio de cultivo sólido NFb (Agar 1.5%, m/v), Agar Ashby (20 g manitol, 0.2 g  $K_2HPO_4$ , 0.2 g  $MgSO_4$ , 0.2 g NaCl, 0.1 g  $K_2SO_4$ , 5g  $CaCO_3$ , 15 g de Agar y 1 l de agua) y el medio de cultivo diseñado en el Laboratorio

de Bioprocesos (6 g manitol, 6 g glucosa, 0.5 g extracto de levadura, 0.5 g  $K_2HPO_4$ , 0.2 g NaCl, 0.005 g  $NaMoO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.005 g  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0.1  $CaCO_3$  en un litro de agua). Se realizaron ensayos por triplicado.

Se seleccionaron colonias grandes y viscosas y se purificaron. Se describió la morfología de la colonia considerando la elevación, margen, superficie y opacidad. Para la identificación de los aislados se realizó una tinción de Gram y adicionalmente se realizaron pruebas bioquímicas de actividad oxidasa, catalasa, KOH y ureasa (Holt *et al.*, 1994; Buchanan y Bagi, 1994). Los aislados con identificación preliminar se nombraron según nomenclatura del laboratorio, se conservaron a 4°C y se conformó una colección de cepas para posteriores análisis.

#### *Fijación biológica de $N_2$*

La fijación de  $N_2$  de las cepas se evaluó por el método indirecto de valoración de ion amonio, utilizando la técnica colorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito) (Weatherburn, 1967). Para la cuantificación de nitrógeno amoniacal se cultivó cada cepa en tubos de ensayo, de 50 ml de capacidad, con 20 ml de medio de cultivo Burk (0.2 g  $l^{-1}$   $Mg_2SO_4$ , 0.8 g  $l^{-1}$   $K_2HPO_4$ , 0.2 g  $l^{-1}$   $KH_2PO_4$ , 0.13 g  $l^{-1}$   $CaSO_4$ , 0.0015 g  $l^{-1}$   $FeCl_3$ , 0.000253 g  $l^{-1}$   $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  y 20 g  $l^{-1}$  de sacarosa con 10% (m/v) de suelo rizosférico estéril. Los tubos se incubaron a 28 °C durante 96 horas a 150 rpm. Terminado la incubación se tomaron 5 ml de cada cultivo y se añadieron 5 ml de KCl 2 M, se homogenizaron y se dejaron en reposo por 1 hora para precipitar, seguido se tomaron los caldos libres de suelo y se centrifugaron a 2 000 rpm por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 0.08 ml de solución alcohólica de fenol al 10% (v/v), 0.08 ml de Nitroprusiato sódico al 0.5% (v/v) y 0.2 ml de solución oxidante (20% de citrato de sodio, m/v; 1% KOH, m/v y 1% de hipoclorito de sodio, v/v 1.5 N). Las soluciones se dejaron reposar por 1 hora y posteriormente se leyó la absorbancia en espectrofotómetro UV/Visible a una longitud de onda de 632.9 nm en el software MetaSpec Pro. Para la estimación de la concentración, se prepararon soluciones de  $NH_4Cl$  en un rango

0.8 - 5.6  $mg l^{-1}$  para realizar la curva patrón. Los ensayos fueron por triplicado. Para conocer la concentración neta fijada de nitrógeno se reemplazó los valores de la absorbancia en la curva patrón estimada, el resultado fue expresado en  $mg l^{-1}$  de nitrógeno fijado como  $NH_4$ . Se seleccionaron las cepas que presentaron los valores más altos de nitrógeno fijado.

#### *Producción de ácido indol acético (AIA)*

Las cepas se inocularon en medio de cultivo caldo Triptófano (Merck) durante de 72 horas a pH 7 y 28 °C. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm por 30 minutos y se recuperó 1 ml del sobrenadante. Seguidamente se agregaron 2 ml del reactivo de Salkowski (4.5 g de  $FeCl_3$  y 10.8 M de  $H_2SO_4$ ; Glickmann y Dessaux, 1995) y se dejó reaccionar por 30 minutos en oscuridad. Para tener mayor agudeza en la detección de AIA se midió la absorbancia en el espectro visible para una muestra de 30  $\mu g ml^{-1}$  de AIA (HIMEDIA) con 2 ml de reactivo de Salkowski. A partir los resultados se seleccionó la longitud de onda ( $\lambda$ ) para leer la absorbancia en una curva patrón de AIA con las concentraciones de 5, 10, 15, 25 y 30  $\mu g ml^{-1}$ . Se seleccionaron las cepas que presentaron los mayores valores de producción de ácido indol acético.

#### *Solubilización de fosfatos*

Se realizaron pruebas cualitativas de solubilización de fosfatos de las cepas. Los resultados positivos fueron evidenciados por la formación de halos de coloración amarilla alrededor de las colonias debido al viraje a pH ácidos. Para ello, se utilizó el medio de cultivo agar SMRS-1 (0.2 g  $l^{-1}$  KCl, 0.5  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.3 g  $l^{-1}$   $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 0.004 g  $l^{-1}$   $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g  $l^{-1}$  NaCl, 5 g  $l^{-1}$   $Ca_3(PO_4)_2$ , 10 g  $l^{-1}$  glucosa, 0.5 g  $l^{-1}$  extracto de levadura, 0.1 g  $l^{-1}$  Púrpura de Bromocresol (Becerra *et al.*, 2011).

Se inoculó cada cepa en medio de cultivo caldo SMRS-1 sin indicador de pH (púrpura de bromocresol), se incubaron a 28 °C y 120 rpm. Después de 24 horas de crecimiento se centrifugó a 2500 RPM por 30 minutos, se recuperó la biomasa y se realizaron lavados celulares, y la concentración celular se ajustó a  $3 \times 10^8$

ufc ml<sup>-1</sup> con la escala de McFarland (McFarland, 1970). Se adicionaron 10 µl en la placa de Petri con medio de cultivo SMRS-1 y se dejó secar la microgota. Como control negativo se inoculó agua destilada estéril. Se identificaron por observación visual los halos de solubilización a los 5 días de incubación (28 °C). Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Para hallar el índice de solubilización se siguió la fórmula utilizada por Santana y Vásquez (2002) índice de solubilización=(diámetro de la colonia + halo)/diámetro de la colonia. Se seleccionaron las cepas que presentaron índices de solubilización elevados.

#### Identificación molecular

Se procedió a la identificación de las cepas seleccionadas para cada una de las actividades promotoras de crecimiento vegetal. Para la extracción de ADN se cosechó una biomasa equivalente a 0.5-2 ml de cada cultivo de entre 4 a 6 horas de crecimiento a 30 °C en medio de cultivo tripticosa de soya (Merk) y se usó el protocolo modificado de Holmes y Quigley (1981). Para ello, se centrifugaron 1.5 ml de cultivo a 13 000 rpm por 5 min, luego se transfirió el *pellet* a 1 ml agua destilada y se incubó por 5 minutos a 100 °C, inmediatamente se congeló a -20 °C por 10 minutos. Luego se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo con dos volúmenes de etanol absoluto frío, se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar al ambiente para luego resuspender con 20 µl de agua.

Para la amplificación de secuencia 16S rRNA por PCR se estandarizó 5 µl de volumen como el requerido para generar los amplicones mediante PCR de la región 16S rRNA. Se fijaron 30 ciclos para los cebadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Para ello se usó la enzima Taq DNA Polimerasa, y se fijó la temperatura de desnaturalización en 95 °C durante 20 segundos, mientras que, la temperatura de anidamiento fue 55 °C por 30 segundos. Finalmente, la temperatura de extensión se fijó en 72 °C por 30 segundos. El producto esperado fue

evaluado por electroforesis en gel de agarosa (1%) y enviado a secuenciar por síntesis en la plataforma ABI 2000 por Macrogen INC. (Korea).

Los cromatogramas se analizaron mediante el software Chromas v 2.6.6 y se compararon las reacciones *forward* y *reverse*. Seguidamente se generó una secuencia consenso entre ambas reacciones. El producto de la reacción fue ingresado a la base de datos BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), usando la opción megablast (secuencias más parecidas).

#### Análisis estadísticos

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se sometieron a pruebas de varianza para determinar las diferencias entre los ensayos, y la prueba de Turkey  $\alpha < 0.05$  para comparar medias entre los ensayos. Los datos se analizaron mediante InfoStat-Statistical Software versión 2018.

#### RESULTADOS

Se realizaron 60 aislamientos de bacterias. El medio de cultivo NFb fue el que permitió realizar la mayor cantidad de aislamientos, de los cuales se seleccionaron 12 por presentar características macroscópicas (culturales), microscópicas y bioquímicas de posibles microorganismos diazotróficos, de acuerdo con el manual de Bergey (Baldani *et al.*, 2015). Todos con colonias circulares, translúcidas y convexas, células de forma bacilar y Gram negativas (Tabla 1) y con actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal (Tabla 2). Los aislados seleccionados, caracterizados e identificados se nombraron como 1A, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 2C, 2D, 2F, 2G, 2J y 2K y formaron parte de la colección de cepas del laboratorio.

La curva patrón obtenida de NH<sub>4</sub>Cl (R<sup>2</sup>=0.9893) en un rango de concentraciones de 0.8 a 5.6 mg l<sup>-1</sup> fue adecuada para la cuantificación de ion amonio en la determinación de forma indirecta de la fijación de nitrógeno atmosférico de las cepas, cultivadas en un medio de cultivo libre de N<sub>2</sub> (Figura 1). Todas las cepas seleccionadas fijaron N<sub>2</sub> atmosférico (Tabla 2).

Tabla 1. Características culturales y bioquímicas de 12 cepas aisladas de la rizosfera de plantas de café (*Coffea* spp.) y seleccionadas por sus actividades promotoras del crecimiento vegetal.

Cepa	Morfología	Margen colonia	Oxidasa	Catalasa	KOH	Ureasa
1A	bacilos	Entero	+	+	D	-
1D	Coco-bacilos	irregular	+	D	+	+
1F	bacilos	entero	+	+	+	+
1G	bacilos	entero	+	+	D	+
1H	Coco-bacilos	entero	-	-	+	+
1I	bacilos	irregular	+	+	+	+
2C	bacilos	entero	+	+	+	+
2D	bacilos	irregular	D	+	+	+
2F	bacilos	entero	+	+	+	+
2G	coco-bacilos	entero	+	+	D	+
2J	bacilos	entero	+	+	+	+
2K	bacilos	entero	D	+	D	+

+ Respuesta positiva, - respuesta -, D respuesta dudosa

Tabla 2. Actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal en cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de plantas de café (*Coffea* spp.).

Cepa	Fijación de nitrógeno (mg l <sup>-1</sup> )	Producción de AIA (µg ml <sup>-1</sup> )	Índice de solubilidad
1A	2.75 ± 0.02g	20.36 ± 3.04a	ND
1E	0.93 ± 0.08a	23.69 ± 1.47a	1.2 ± 0.00
1F	1.43 ± 0.11cd	ND	2.39 ± 0.54
1G	1.32 ± 0.13bcd	66.38 ± 10.34c	1.25 ± 0.19
1H	1.08 ± 0.03ab	ND	ND
1I	2.05 ± 0.11f	66.03 ± 10.95c	1.31 ± 0.10
2C	1.05 ± 0.12ab	72.35 ± 0.00c	1.36 ± 0.04
2D	1.07 ± 0.09ab	44.46 ± 11.27b	2.61 ± 0.35
2F	1.85 ± 0.18ef	15.43 ± 0.64a	ND
2G	1.54 ± 0.16de	25.10 ± 0.76a	2.00 ± 0.17
2J	1.16 ± 0.06abc	21.06 ± 0.03a	3.08 ± 0.29
2K	1.16 ± 0.02abc	21.36 ± 3.46a	2.83 ± 0.29

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas según la prueba de Turkey para  $p \leq 0.05$ , ND: no determinado, ± error estándar

Las cepas 1A y 1I presentaron la mayor concentración en este método. De acuerdo con los resultados, la cepa 1A y 1I obtuvieron 2.75 y 2.05 mg l<sup>-1</sup> respectivamente (Tabla 2).

De acuerdo con los resultados de las lecturas de la solución de AIA (30 µg ml<sup>-1</sup>) en el espectro UV-vis se determinó como  $\lambda_{\text{máx}}$  531 nm (Figura 2). Por otro lado, la curva patrón

obtenida tuvo un  $R^2=0.988$  (Figura 3). Los resultados de los análisis mostraron que el 83.3% de las cepas poseían la capacidad de sintetizar AIA (Tabla 2). En este grupo se encontró la cepa 2C la cual producía 72.35

$\mu\text{g ml}^{-1}$  luego de dos días de incubación en medio de cultivo con triptófano. Otras cepas con elevada producción de AIA fueron 1I y 1G con 66.03 y 66.38  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente (Tabla 2).

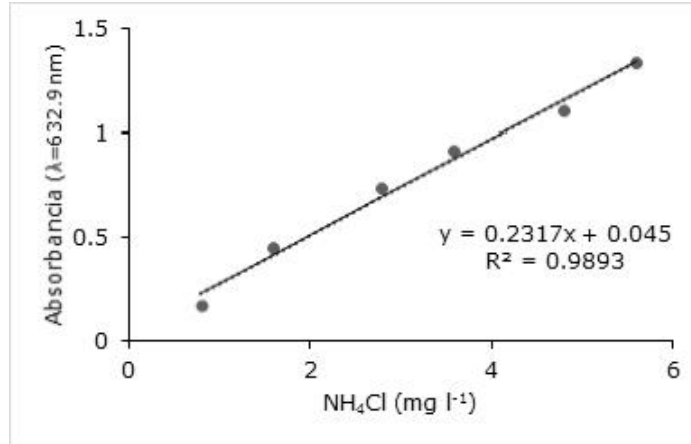


Figura 1. Curva patrón para  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en un rango de concentraciones de 0.8 a 5.6  $\text{mg l}^{-1}$ . n=3.

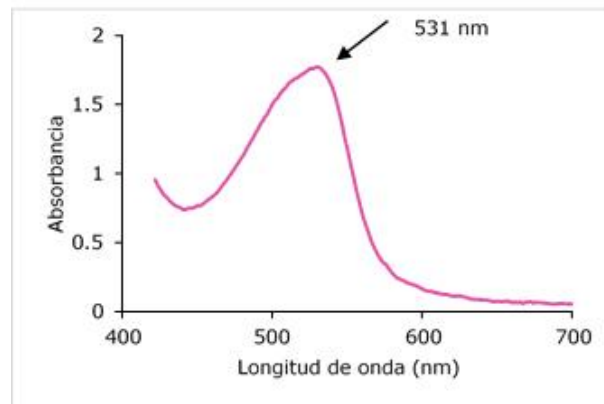


Figura 2. Espectro de absorción en el espectro visible para la reacción del reactivo de Salkowski con AIA (30  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

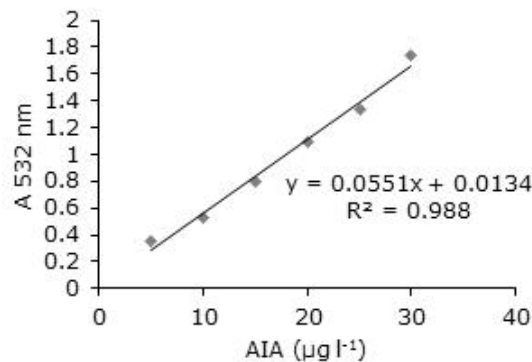


Figura 3. Curva patrón para AIA en un rango de concentraciones de 5 - 35  $\mu\text{g l}^{-1}$ . n=3.

De acuerdo con los resultados de índice de solubilización se observó que el 75% de las cepas poseía capacidad de solubilización de fosfatos (Tabla 2). Las cepas con mayores índices fueron 2J, 2K y 2D con 3.08, 2.83 y 2.61 respectivamente.

Atendiendo a los resultados de los ensayos de actividad promotora del crecimiento *in vitro*, para la identificación molecular se seleccionaron las cepas 1I, 1A, 2C (Figura 4) y 2J. En general, las secuencias analizadas mostraron un porcentaje de similitud alto (Tabla 3). Ello, excepto para la cepa 1A que mostró un valor bajo para esta puntuación, debido a la baja calidad de la secuencia, indicó una identificación confiable de las secuencias buscadas. Se identificaron tres géneros: *Azospirillum* (Figura 4), *Pseudomonas* y *Burkholderia*.

#### DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio corroboraron hallazgos previos de otros autores relacionados con que de la rizosfera de plantas

de *Coffea* spp. se pueden aislar bacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal.

En este sentido, trabajos como el de Jiménez-Salgado *et al.* (1997) mostraron que la mayor diversidad relacionada con la rizosfera de *Coffea arabica* estaba dominada por acetobacterias, como las principales responsables de la fijación de N<sub>2</sub> y no encontraron aislados de *Azotobacter*. Otros autores tampoco lograron aislar este género de la rizosfera y suelo no rizosférico de plantas de cafeto pero identificaron la presencia de *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Muleta *et al.*, 2007a; Muleta *et al.*, 2007b; Muleta *et al.*, 2009; Muleta *et al.*, 2013). Incluso, estudios más recientes con enfoques metagenómicos a la rizosfera de cafetales coinciden con el hecho de no haber encontrado género de *Azotobacter* (Ogutu *et al.*, 2016). Sin embargo, en casi todos los estudios mencionados se logró aislar *Azospirillum* spp. Una de las características más destacadas del género *Azospirillum* y de otros diazotróficos es la fijación biológica de N<sub>2</sub> (Baldani *et al.*, 2015).



Figura 4. Colonias translúcidas típicas del género *Azospirillum* en medio de cultivo NFb. (a) Cepa 1I (*Azospirillum amazonense*), (b) Cepa 1A (*Azospirillum* sp.) aisladas de la rizosfera de *Coffea* spp.

Tabla 3. Identificación resultante según el gen 16SrRNA, de las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de *Coffea* spp., seleccionadas por su actividad *in vitro* como promotoras de crecimiento vegetal.

Cepa	Especie	S ab score	Oligómeros únicos en común
1I	<i>Azospirillum amazonense</i>	0.969	1400
2C	<i>Burkholderia gladioli</i>	0.991	1488
2J	<i>Pseudomonas putida</i>	0.981	1327
1A	<i>Azospirillum</i> sp.	0.475	1325

En el presente estudio se obtuvieron cepas de *Azospirillum*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* de la rizosfera de plantas de cafeto con actividades promotoras del crecimiento vegetal. Algunas cepas con más de un tipo de actividad como *Azospirillum amazonense* 11, que posee actividad de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de compuestos indólicos. Otras que se destacaron por un tipo de actividad como *Burkholderia gladioli* cepa productora de compuestos indólicos y *Pseudomonas putida* cepa solubilizadora de fosfatos.

También en Perú, Fernández (2015) obtuvo cepas de *Azotobacter* y *Pseudomonas* de la rizosfera de cafeto, en el distrito Naranjal de la provincia de Chanchamayo, como principales promotoras de crecimiento vegetal. Sin embargo, no aislaron bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Burkholderia* a pesar de la cercanía geográfica con los sitios muestreados en este estudio.

Es común obtener aislados de suelo rizosférico con capacidad de fijar  $N_2$ . Sin embargo, muchos estudios estiman la actividad nitrogenasa a través del ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968) por ser más sensible y preciso. Sin embargo, es necesario disponer de equipamiento para la cuantificación. En este contexto, el método de Berthelot (Weatherburn, 1967) para estimar el  $N_2$  fijado mediante la cuantificación de nitrógeno amoniacal se posiciona como una alternativa. De acuerdo con los resultados obtenidos en la curva patrón de  $NH_4Cl$  ( $R^2=0.98$ ) se constató que las 12 cepas obtenidas alcanzaron concentraciones entre  $0.93 \pm 0.08$  y  $2.75 \pm 0.02$   $mg\ l^{-1}$ . Otros autores han utilizado este método con resultados satisfactorios (Piña *et al.*, 2016).

Los valores de producción de AIA por las cepas obtenidas en el presente trabajo fueron altos con respecto a otros estudios. Por ejemplo, Clavijo *et al.* (2012) con cepas de *Sphingobium scionense* alcanzaron valores cercanos a  $46.47$   $im\ ml^{-1}$ . En otro caso, Angulo *et al.* (2014) obtuvieron hasta  $28.09$   $ig\ ml^{-1}$  de AIA en una cepa de *Rahnella aquatillis*. No obstante, es ampliamente conocido que *Azospirillum* sp. posee la propiedad de sintetizar altas cantidades de AIA (Kumar y Rao, 2012).

Fernández (2015) demostró que cepas de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*, aislados de rizosfera de cafetos, solubilizan fosfatos en sus dos componentes: bicálcico y tricálcico. Este autor refirió que el 88% y 93% de las cepas de los dos géneros, respectivamente, solubilizan fosfatos. Porcentajes mayores al encontrado en la presente investigación solo con fosfato tricálcico.

Las cepas identificadas mostraron importantes resultados como promotoras de crecimiento vegetal. El género *Azospirillum* pertenece a un grupo de bacterias Gram negativas, fijador de nitrógeno, productor de auxinas, giberelinas y citocininas, así como de producir sideróforos y bacteriocinas (Tapia-Hernández *et al.*, 1990). De igual forma, las especies de *Burkholderia* se refieren como fijadoras de nitrógeno con gran potencial de uso como promotoras de crecimiento vegetal, en la biorremediación y el control biológico (Caballero-Mellado *et al.*, 2007). Por otra parte, *Pseudomonas putida* se reconoce como una especie eficiente en la solubilización de fosfatos y en la producción de AIA (Patten y Glick, 2002; Upadhyay *et al.*, 2009). La presencia nativa de estas especies en la región cafetalera de Perú es importante porque abre la posibilidad de utilizarlos como biofertilizantes. Estas bacterias juegan un papel importante para el incremento de la productividad y el manejo del cultivo. La diversidad microbiana rizosférica lleva una variedad de microorganismos que ofrecen propiedades beneficiosas para los ecosistemas de las plantas (Bhardwaj *et al.*, 2014; Chojnacka, 2015).

Estos resultados sientan las bases para estudios exhaustivos y continuos de su campo de aplicabilidad como inoculantes potencialmente importante para las prácticas agrícolas en el cultivo del cafeto. Inoculaciones con potentes microorganismos nativos están de acuerdo con opiniones contemporáneas sobre el posible rol de microorganismos promotores del crecimiento vegetal y que sostienen el suelo para mejorar los rendimientos.

## CONCLUSIONES

Cepas bacterianas nativas de la rizosfera de plantas de cafeto de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* poseen actividad



*in vitro* de promoción del crecimiento vegetal. Esto las convierte en potenciales biofertilizantes para el cultivo.

#### Conflicto de interés

Los autores no presentan conflicto de intereses.

#### REFERENCIAS

Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sossa KE (2014) Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de Microbiología 46(4): 338-347; doi: 10.1016/s0325-7541(14)70093-8

Arjun DJ, Roshan BO, Sushma M (2015) Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—A Review. Advances in Plants y Agriculture Research 2(6): 250-253; doi: 10.15406/apar.2015.02.00069

Baldani JI, Krieg NR, Baldani VLD, Hartmann A, Döbereiner J (2015) *Azospirillum*. En: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S (eds). Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, pp. 1-35. John Wiley & Sons Inc, Baltimore; doi: 10.1002/9781118960608.gbm00891

Becerra JM, Quintero D, Martinez M, Matiz A (2011) Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 5(2): 195-208

Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja N (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. Microb Cell Fact 13: 66-73; doi: 10.1186/1475-2859-13-66

Buchanan RL, Bagi LK (1994) Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157/ : H7 to include sodium nitrite as a variable. International Journal of Food Microbiology 23(3-4): 317-332; doi: 10.1016/0168-1605(94)90160-0

Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L (2007) The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich

in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. Applied and Environmental Microbiology 73(16): 5308-5319

Caldwell AC, Silva LCF, Da Silva CC, Ouverney CC (2015) Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional *Coffee* farms in Brazil. PLoS one 10(6): 1-17; doi: 10.1371/journal.pone.0106355

Cárdenas DM, Garrido MF, Bonilla RR, Baldani VL (2010) Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Pastos y Forrajes 33(3): 1-1

Chojnacka K (2015) Innovative bio-products for agriculture. Open Chem 13: 932-937; doi: 10.1515/chem-2015-0111

Clavijo C, Chipana V, Centeno J, Zúñiga D, Guillén C (2012) Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizosfera del cultivo de *Olea europea* olivo en Tacna Perú. Ecología Aplicada 11(2): 89-102

Creus CM (2017) Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. Revista Argentina de microbiología 49(3): 207-209; doi: 10.1016/j.ram.2017.07.001

Cuba SF, Ita MN (2017) Guía climática turística. Ministerio de medio ambiente. Servicio Nacional de meteorología e hidrología del Perú. Disponible en: <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/01401SENA-20.pdf>. Consultado 08/05/2019

Fernández JC (2015) Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de café (*Coffea arabica* L. var. ½típica¼) en sus primeros estadios de su desarrollo. Tesis para optar al título de Biólogo, Universidad Nacional Agraria, La Molina, Perú

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

Hardy RW, Holsten R D, Jackson E K, Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>

- fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiology* 43(8): 1185-1207
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114(1): 193-197; doi: 10.1016/0003-2697(81)90473-5
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S (1994) *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland
- Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez LE, Tapia-Hernández A, Mascarua-Esparza MA, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(9): 3676-3683
- Kumar SS, Rao KB (2012) Biological nitrogen fixation: A Review. *International Journal of Advanced Life Sciences* 1: 1-6
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology* 63: 541-556
- McFarland J (1970) The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. En: Campbell HD, Garvey SJ, Cremer EN, Sussdorf HD (eds). *Methods in immunology*, pp. 435-437. Benjamin, New York
- Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, Divya KL, Venkatasalam EP, Srinivasa S, Ramkumar G, Saranya C, Shanmuganathan R (2018) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for Nematodes bio-control. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16(1): 163-171; doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.009
- Minagri (2018) Comercio Agrario Exterior. Perú. Dirección general de seguimiento y evaluación de políticas. Disponible en: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/nota-comercio-exterior-enero18.pdf>. Consultado 07/05/2019
- Muleta D, Assefa F, Börjesson E, Granhall U (2013) Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 12(1): 73-84; doi: 10.1016/j.jssas.2012.07.002
- Muleta D, Assefa F, Granhall U (2007b) *In vitro* antagonism of rhizobacteria isolated from *Coffea arabica* L. against emerging fungal coffee pathogens. *Engineering in Life Sciences* 7(6): 577-586; doi: 10.1002/elsc.200700004
- Muleta D, Assefa F, Hjort K, Roos S, Granhall U (2009) Characterization of *Rhizobacteria* Isolated from Wild *Coffea arabica* L.. *Engineering in Life Sciences* 9(2): 100-108; doi: 10.1002/elsc.200700031
- Muleta D, Assefa F, Nemomissa S, Granhall U (2007a) Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. *Forest Ecology and Management* 241(1-3): 145-154; doi: 10.1016/j.foreco.2007.01.021
- Ogutu C, Fang T, Yan L, Wang L, Huang L, Wang X, Ma B, Deng X, Owiti A, Han Y (2016) Characterization and utilization of microsatellites in the *Coffea canephora* genome to assess genetic association between wild species in Kenya and cultivated coffee. *Tree Genetics and Genomes* 12(3): 6-9; doi: 10.1007/s11295-016-1014-y
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68: 3795-3801
- Perú Opportunity Fund (2011) Diagnóstico de la Agricultura en el Perú. Lima, Perú: LIBELULA, comunicación, ambiente y desarrollo. Disponible en: [https://www.sudamericarural.org/images/en\\_papel/arc\\_hivos/Diagno\\_stico\\_de\\_la\\_Agricultura\\_en\\_el\\_Peru\\_-\\_web.pdf](https://www.sudamericarural.org/images/en_papel/arc_hivos/Diagno_stico_de_la_Agricultura_en_el_Peru_-_web.pdf). Consultado 07/05/2019
- Piña G J, García V, Herrera H, Torres J (2016) Valoración de cepas silvestres de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(7): 1613-1623

Santana M, Vásquez C (2002) Evaluación de cepas de *Azotobacter* sp. y de bacterias solubilizadoras de fosfato (BFS), como biofertilizante mixto en un cultivo crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Var. Regal suerte). Tesis de pregrado para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Tapia-Hernandez A, Mascarua-Esparza MA, Caballero-Mellado J (1990) Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* 64(259): 73-83

Upadhyay SK, Singh DP, Saikia R (2009) Genetic diversity of plant growth promoting

rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr Microbiol* 59: 489-496

Weatherburn MW (1967) Phenol hipoclorite reaction determination of ammonia. *Anal Chem* 39: 971

Recibido: 13-08-2019

Aceptado: 17-10-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.