

Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea Batatas* del Caribe Colombiano

Characterization and effect of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Pseudomonas* associated with *Ipomoea Batatas* of Colombian Caribbean

Jazmín Vanessa Pérez-Pazos*, Diana Beatriz Sánchez-López**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69471

RESUMEN

El uso de Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) constituye una alternativa al uso de fertilizantes químicos favoreciendo el rendimiento de los cultivos. La presente investigación tuvo como objetivo la búsqueda, selección y caracterización de PGPR de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* nativas de la rizósfera de cultivos de *Ipomoea batatas* de zonas productoras representativas del Caribe Colombiano. Los aislados seleccionados se caracterizaron molecularmente y realizaron pruebas de solubilización de fósforo, producción de índoles y reducción de acetileno. Las cepas fueron probadas a nivel de invernadero en plántulas de *Ipomoea batatas* producidas *in vitro* en las que se evaluó la altura, longitud radicular, masa seca de la parte aérea y radicular. Asociada a la rizósfera de *Ipomoea batatas* se obtuvieron cepas de *Azotobacter vine-landii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas denitrificans*, las cepas fueron capaces de solubilizar fósforo, producir índoles y reducir acetileno. Se obtuvo incrementos en parámetros de crecimiento como longitud radicular, altura, peso seco aéreo y radicular en plántulas de *Ipomoea batatas* en invernadero con la inoculación de las bacterias seleccionadas frente a plántulas sin inocular. Los resultados catalogan a los aislados obtenidos como posibles microorganismos con potencial como biofertilizantes en batata.

Palabras clave: Bioestimulantes, Fijación de nitrógeno, Índoles, Rizósfera, PGPR.

* B.Sc Bióloga. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Centro de Investigación Turipaná. Km 13 Vía Montería - Cereté, Córdoba, Colombia. jyperez@corpoica.org.co. Código ORCID: 0000000218898248.

** M.Sc. Ciencias Biológicas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Centro de Investigación Turipaná. Km 13 Vía Montería - Cereté, Córdoba, Colombia. dbsanchez@corpoica.org.co. Código ORCID: 0000000197154097.

ABSTRACT

The use of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) is an alternative to replace chemical fertilizers for the cultivation of agricultural crops. The aim of this research was to search, selection and characterization of PGPR from the genus *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Pseudomonas* natives from sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants and rhizosphere of representative production regions of the Colombian Caribbean. Selected isolates were identified by molecular methods and they were screened *in vitro* for activities related to plant growth such as phosphate solubilization, indole production and acetylene reduction. The strains were tested in the greenhouse on plants of *Ipomoea batatas* produced *in vitro*. The height, root length, dry mass of the shoot and root were evaluated. Associated with sweet potato crop we found strains identified as *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas denitrificans*. The strains were able to solubilize phosphate, synthesize indole-3-acetic acid (IAA) and reduce acetylene. The inoculation of bacteria selected increased growth parameters such as root length, height, dry weight root and shoot in plants of sweet potato in greenhouse. Those results catalog to the isolated obtained as possible microorganisms with potential as biofertilizers in sweet potato.

Key words: biostimulants, Nitrogen fixation, Indoles, Rhizosphere, PGPR.

Recibido: marzo 1 de 2017 **Aprobado:** noviembre 14 de 2017

Introducción

La batata es un cultivo de subsistencia y juega un papel importante en el sistema de seguridad alimentaria en el mundo (Marques *et al.*, 2015). La raíz tuberosa de la batata tiene alto contenido de carbohidratos y un alto valor nutricional siendo ampliamente usada en la alimentación (Ghyselinck *et al.*, 2013). En la producción de batata la fertilización es muy importante ya que una mala nutrición de las plantas reduce los contenidos de almidón y glucosa afectando la calidad de las raíces y con ello su comercialización (Santos *et al.*, 2006). En consecuencia, la producción de batata requiere el uso de fertilizantes químicos que son costosos y su impacto ambiental es negativo (Dawwam *et al.*, 2013).

Una de las alternativas al problema de la fertilización es el uso de bacterias rizosféricas con propiedades de promoción de crecimiento vegetal. Estas bacterias usan mecanismos como fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de índoles y sideróforos (Marques *et al.*, 2015), para favorecer la toma de nutrientes y así promover el crecimiento vegetal.

En la rizósfera están presentes diferentes géneros bacterianos entre los que se destacan *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, *Rhizobium*, entre otros (Selvakumar *et al.*, 2012), los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* son ampliamente utilizados por sus características como fijadores de nitrógeno (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Faccini *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008; Yasmin *et al.*, 2010), la capacidad de producir índoles (Ahmad *et al.*, 2005; Malhotra y Srivastava, 2009; Yasmin *et al.*, 2010; Dawwam *et al.*, 2013) y solubilizar fósforo (Kumar y Narula, 1999; Guang-Can *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009; Sashidhar y Podile, 2009), propiedades que hacen de estos microorganismos potenciales como biofertilizantes.

Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo de esta investigación fue aislar, seleccionar y caracterizar bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* nativas de la rizósfera de cultivos de batata de diferentes regiones del Caribe Colombiano por su potencial como promotoras de crecimiento vegetal.

Tabla 1. Fincas seleccionadas para el aislamiento de bacterias asociadas al cultivo de batata en el Caribe Colombiano.

Zonas	Código	Nombre	Vereda	Municipio	Coordenadas	
		Del Predio	/Corregimiento	/Departamento	N	W
Montes De María	B01	Barrios	Caracolí	Carmen de Bolívar / Bolívar	9°44'24.8"	75°13'28.2"
	B02	Buenos Aires	Mala noche	Carmen de Bolívar / Bolívar	9°45'36"	75°06'59.5"
Sabanas Colinadas	B03	Fronteras	Las Tinas	Corozal / Sucre	9°17'55"	75°18'55"
	B04	Salgados	Las Tinas	Corozal / Sucre	9°15'42"	75°18'42"
	B05	El Rosario	Las Tinas	Corozal / Sucre	9°15'08"	75°19'09"
	B06	Puerta Roja	Las Palmas	Corozal / Sucre	9°15'48"	75°20'30"
	B14	Marbella	Las Nubes	San Antero / Córdoba	9°20'52"	75°47'39"
	B07	Las Flores	Las Casitas	Valledupar / Cesar	10°44'24"	73°15'37"
Valle Del Cesar	B08	Mi Negra	Varas Blancas	La Paz / Cesar	10°24'58"	73°08'39"
	B09	Institución Educativa Técnica Agropecuaria	Moreneros (Tomarrazon)	Fonseca / Guajira	10°53'21"	72°51'42"
	B10	La mano de Dios	Mingueo	Riohacha / Guajira	11°07'00"	72°59'27"
	B11	Gerizin	Codazzi	Dibulla / Guajira	11°12'45"	73°24'14"
	B12	C.I Motilonia	Retiro de los Indios	Valledupar / Cesar		
Valle Del Sinú	B13	C.I Turipaná	La Doctrina	Cereté / Córdoba	8°50'48"	75°48'57"
	B15	Cultivo comercial		Santa Cruz de Lorica / Córdoba	9°20'55"	75°51'3"

Materiales y Métodos

Aislamiento de bacterias nativas del cultivo de batatas (*Ipomoea batatas*)

Las bacterias se aislaron de muestras de suelo rizosférico, hojas y tallos de diferentes zonas del Caribe Colombiano, se visitaron en total 15 fincas productoras de batata representativas de las zonas Valle del Sinú, Montes de María, Sabanas Colinadas y Valle del Cesar (tabla 1).

En cada finca se colectó una muestra de suelo para análisis físico-químico y una muestra de suelo rizosférico para análisis microbiológico. Cada muestra compuesta por cinco submuestras colectadas en forma de x. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas al Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Centro de Investigación Turipaná, para su procesamiento.

Las muestras de suelo rizosférico fueron homogeneizadas y procesadas en el laboratorio. Se tomó una

muestra de 10 g de suelo y se diluyó en 90 mL de NaCl estéril al 0.85%, con una agitación de 150 rpm durante 15 minutos. Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-7} , se inoculó 0,1 mL en medios de cultivo Tripticasa soya Agar (TSA)® para aislamiento de mesófilos aerobios. Segmentos de tallos y hojas fueron sembrados en medio Nfb semi-sólido (Döbereiner *et al.*, 1995) para aislamiento de *Azospirillum*, y en medio cultivo Ashby se realizó siembra de granúlos de suelo (Fenglerowa, 1965) para el aislamiento de *Azotobacter*, las colonias que presentaron características asociadas al género fueron purificadas (Berge & Holt 1994). Los morfotipos puros fueron conservados en microtubos con medio y aceite mineral estéril (Carrillo *et al.*, 1998).

Caracterización molecular de bacterias nativas de cultivos de batata

La caracterización molecular se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen *rpoB*. La extracción de ADN de las bacterias seleccionadas se realizó con el kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Hand-

book (QUIAGEN, Alemania) a partir de una suspensión bacteriana cultivada en medio Luria - Bertani (LB) toda la noche. La amplificación del gen *rpoB* se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, mediante el Kit PCR Master Mix (ThermoScientific), los primers utilizados en la PCR fueron *rpoB1698f* (5-AACATCGGTTTGATCAAC-3) y *rpoB2041r* (5-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3) (Dahllof *et al.*, 2000). La PCR se realizó en un termociclador Multigene Optimax de Labnet. El programa para la PCR fue como sigue: denaturación a 94 °C por 3 min seguido por 10 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min, alineación a 50°C por 1.5 min y extensión por 2 min a 72 °C seguido por 25 ciclos de denaturación por 1 min a 94 °C, alineación a 50 °C por 1.5 min y extensión por 2 min a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación a Macrogen - Korea. Las secuencias obtenidas se limpiaron y ensamblaron en una secuencia consenso que fue alineada con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI mediante la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Determinación de la actividad promotora de crecimiento *in vitro* de bacterias nativas de la rizósfera de cultivos de Batata

Se realizaron pruebas de habilidades de promoción de crecimiento *in vitro*, solubilización de fósforo (Fiske y Subbarow, 1925), producción de reguladores de crecimiento vegetal como índoles (Glickmann y Desaux, 1995) y fijación de nitrógeno (mediante el ensayo de reducción de acetileno) (Hardy *et al.*, 1968). Se realizó la evaluación de la compatibilidad entre bacterias (Shank *et al.*, 2011).

La determinación cuantitativa de solubilización de fósforo se realizó mediante la determinación de ortofosfatos en medio SRSM-PR modificado con roca fosfórica al 0.5% como fuente de fósforo (gl^{-1} : glucosa 10, extracto de levadura 0,5; $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 0,5; KCl 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; pH: 7,2). Las muestras se incubaron por 5 días a 30 ± 2 °C a 150 rpm (Sánchez *et al.*, 2012), la medición y lectura se realizó mediante la técnica de azul

de fosfomolibdeno a una absorbancia de 712 nm (Fiske y Subbarow, 1925).

La producción de índoles totales se evaluó mediante el ensayo colorimétrico descrito por Glickmann y Desaux (1995). Para esto se empleó el medio de cultivo K-lactato suplementado con triptófano a 100 mgL^{-1} (Sánchez *et al.*, 2012) incubándose los cultivos a 30 ± 2 °C durante 72 h a 150 rpm en la oscuridad. Para la lectura se empleó el reactivo de Salkowsky ($\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12 gl^{-1} en H_2SO_4 7,9M) en una relación 1:1 con la suspensión bacteriana, dejándose reaccionar durante 30 min en oscuridad. La lectura de absorbancia se realizó a 450 nm.

Para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno se realizó el ensayo de reducción de acetileno (ARA). Los aislamientos seleccionados fueron reactivados y posteriormente cultivados en tubos de 10 mL con medio NFB semisólido, 72 horas después del cultivo se agregó a la atmósfera 1mL de acetileno y se incubó a 30 °C por 24 horas. El total de la atmósfera (6 mL) se extrajo y se almacenó en tubos vacutainer. La producción de acetileno fue medida usando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A) con detector de ionización de llama y columna Haye-SepN 80-100 mesh. 20 ft x 1/8" x 20 mm Ultimetal (Hardy *et al.*, 1968).

Para la prueba de compatibilidad las cepas se incubaron hasta una densidad óptica de 0,5 en caldo LB, posteriormente la primera cepa se colocó en placas de LB y se cultivaron durante cinco días a 30 °C. La segunda cepa se diluyó en agar LB [1,5% (peso / vol)] que se había fundido y enfriado a una temperatura de 30 °C y se vertió en placas hasta solidificación, posteriormente trozos de la segunda cepa se voltearon sobre la primera cepa. Después del crecimiento durante 24 horas a 30 °C, se observaron las placas, la presencia de halos indicó incompatibilidad de las cepas (Shank *et al.*, 2011).

Evaluación de bacterias asociadas al cultivo de batata, capaces de promover el crecimiento vegetal en plántulas de batata en casa de malla

Tabla 2. Caracterización molecular de bacterias con potencial como biofertilizantes aisladas de la rizósfera de batata en diferentes zonas del Caribe Colombiano.

Zona	Localidad	Cepa	Identificación	Porcentaje de Identidad	Accesión	Patogenicidad humana ^a	Patogenicidad vegetal ^b
Montes De María	Carmen de Bolívar	IBCB15	<i>Azotobacter vinelandii</i>	98%	CP005095.1	Grupo1	No patógena
		IBCB10	<i>Azotobacter vinelandii.</i>	98%	CP005095.1	Grupo 1	No patógena
	Corozal	IBCR19	<i>Azotobacter chroococcum</i>	88%	CP010415.1	Grupo 1	No patógena
Sabanas Colinadas	San Antero	IBSC7	<i>Azospirillum lipoferum</i>	94%	FQ311868.1	Grupo 1	No patógena
Valle del Cesar	Codazzi	IBVC74	<i>Azotobacter vinelandii</i>	98%	CP005095.1	Grupo 1	No patógena
		IBVC57	<i>Azotobacter vinelandii</i>	97%	CP005095.1	Grupo 1	No patógena
	La Paz	IBVC76	<i>Azospirillum brasilense</i>	90%	HE577327.1	Grupo 1	No patógena
	Valledupar	IBVC69	<i>Azotobacter chroococcum</i>	88%	CP010415.1	Grupo 1	No patógena
Valle Del Sinú	Cereté	IBVS2	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	95%	CP004143.1	Grupo 1	No patógena
		IBVS13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	97%	CP005095.1	Grupo 1	No patógena

^a Tomado del catálogo de la colección Bélgica de microorganismos <http://bccm.belspo.be/catalogues/lmg-catalogue-search>

^b Tomado del catálogo de la Colección Nacional de bacterias patógenas de plantas del Reino Unido. <http://www.ncppb.com>

Se realizó una evaluación bajo condiciones de casa de malla con plántulas de *Ipomoea batatas* de la variedad 15020063 obtenidas *in vitro* con el protocolo código I-PL-INV-01-01 y proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación Turipaná. Las plántulas de batata se establecieron en bandejas de 28 alveolos con muestras de suelos sin esterilizar procedentes de las zonas de aislamiento de las bacterias seleccionadas. Las plántulas fueron inoculadas con 5 mL de la suspensión bacteriana, correspondiente a una concentración celular de 1×10^8 UFC.mL⁻¹ en medio nutritivo (g/L¹: glucosa 0,5; extracto de levadura 0,5; peptona 0,5; caseína 0,5; almidón 0,5; K₂HPO₄ 0,30; MgSO₄ 0,05; 17,0 pH: 7). Se realizaron dos inoculaciones a los 10 y 30 días después de la siembra. El diseño experimental fue completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento (3 plantas/ Unidad Experimental) y se determinó un control absoluto para cada zona. Como variables respuesta se establecieron la altura de la parte aérea y radicular

(cm), masa seca de la parte aérea y radicular (g) evaluadas 45 días después de crecimiento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software SPSS 22.00 para Windows. Los datos obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para discriminar entre las medias se utilizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confianza.

Resultados y Discusión

Aislamiento de bacterias nativas del cultivo de batatas (*Ipomoea batatas*)

Se aislaron 113 morfotipos bacterianos, de estos microorganismos se seleccionaron 10 morfotipos con características asociadas a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* reportados como promo-

tores de crecimiento vegetal (Mahendran *et al.*, 1996; Faccini *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008; Dawwam *et al.*, 2013; Ghyselincka *et al.*, 2013; Singh, 2013), dos morfotipos para las zonas de los Montes de María, Sabanas Colinadas y Valle del Sinú y cuatro para el Valle del Cesar.

Caracterización molecular de bacterias nativas de cultivos de batatas

Los microorganismos seleccionados fueron caracterizados mediante la amplificación del gen *rpoB*, las bacterias obtenidas corresponden a *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas denitrificans* (tabla 2). Las bacterias identificadas presentan riesgo biológico del grupo 1 por tanto la probabilidad de que cause enfermedad en seres humanos es baja. Se puede distribuir sin restricciones teniendo en cuenta las medidas básicas de bioseguridad (tabla 2). Los aislados fueron considerados no patógenos de plantas porque no se presentaron en el catálogo de la Colección Nacional de bacterias patógenas de plantas del Reino Unido (tabla 2).

Determinación de la actividad promotora de crecimiento *in vitro* de bacterias nativas de la rizósfera de cultivos de Batata

En las bacterias seleccionadas se realizaron pruebas bioquímicas de habilidades de promoción de crecimiento *in vitro* como solubilización de fósforo y producción de índoles (tabla 3).

Los resultados indican que todas las bacterias seleccionadas presentan actividad como promotoras de crecimiento vegetal ya que son capaces de solubilizar fósforo y producir índoles *in vitro*, habilidades que caracterizan a las PGPR (Rokhbakhsh-Zamin *et al.*, 2011; Dawwam *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2015).

La solubilización de fósforo, medida como la disponibilidad de ortofosfatos, se encuentra en el rango de 4 a 23 ppm, estos valores son inferiores si se compara con reportes obtenidos por Park *et al.* (2010) y Dawwam *et al.* (2013) que indican que bacterias aisladas de plantas tuberosas de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*, solubilizan fósforo en un rango

Tabla 3. Determinación de actividad promotora de crecimiento vegetal de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de cultivos de batata en diferentes zonas del Caribe Colombiano.

Zona	Cepa	Identificación	Ortofosfato Disponible (ppm)	Índoles Totales ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Montes de María	IBCB15	<i>Azotobacter vinelandii</i>	4,34 \pm 0,11	40,56 \pm 2,68
	IBCB10	<i>Azotobacter vinelandii</i>	4,38 \pm 0,70	17,51 \pm 1,21
Sabanas Colinadas	IBCR19	<i>Azotobacter chroococcum</i>	9,36 \pm 0,48	49,72 \pm 2,42
	IBSC7	<i>Azospirillum lipoferum</i>	7,14 \pm 0,06	7,41 \pm 0,54
Valle del Cesar	IBVC74	<i>Azotobacter vinelandii</i>	3,83 \pm 0,09	65,60 \pm 2,69
	IBVC57	<i>Azotobacter vinelandii</i>	12,88 \pm 0,43	41,68 \pm 3,68
	IBVC76	<i>Azospirillum brasilense</i>	19,58 \pm 0,64	65,08 \pm 0,77
	IBVC69	<i>Azotobacter chroococcum</i>	23,34 \pm 1,66	138,75 \pm 3,49
Valle del Sinú	IBVS2	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	19,45 \pm 0,40	52,33 \pm 1,10
	IBVS13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	20,71 \pm 1,04	41,17 \pm 0,84

Tabla 4. Reducción de Acetileno obtenido por bacterias aisladas de la rizósfera de *Ipomoea batatas* de diferentes zonas del Caribe Colombiano.

ZONA	CEPA	IDENTIFICACIÓN	ACETILENO (mmol.mol ⁻¹ .h ⁻¹)
CONTROL NEGATIVO			0,350±0,06 cd
Montes de María	IBCB15	<i>Azotobacter vinelandii</i>	0,366±0,10 cd
	IBCB10	<i>Azotobacter vinelandii</i>	0,412±0,16 d
	IBCR19	<i>Azotobacter chroococcum</i>	0,282±0,07 bcd
Sabanas Colinadas	IBSC7	<i>Azospirillum lipoferum</i>	0,223±0,03 ab
	IBVC74	<i>Azotobacter vinelandii</i>	0,074±0,01 a
Valle del Cesar	IBVC76	<i>Azospirillum brasilense</i>	0,151±0,02 ab
	IBVS2	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	0,415±0,05 d
Valle del Sinú	IBVS13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	<u>0,439±0,03 d</u>

Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas según el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confiabilidad.

de 100 a 290 µg.mL⁻¹, los géneros bacterianos *Bacillus* y *Pseudomonas* son ampliamente reportados como potenciales solubilizadores de fósforo (Guang-Can et al., 2008; Khan et al., 2009; Sánchez et al., 2016).

Aunque el género *Azotobacter* no ha sido reportado como buen solubilizador de fósforo, Kumar y Narula (1999) reportaron que cepas mutantes de *Azotobacter chroococcum* fueron capaces de solubilizar roca fosfórica en el rango de 0,19 - 0,22 µg.mL⁻¹ valores inferiores a los obtenidos en esta investigación (tabla 3). La bacteria IBVC69 (*Azotobacter chroococcum*) aislada del Valle del Cesar logró solubilizar la mayor cantidad de fósforo (23,34 ppm). Sashidhar y Podile (2009) reportaron la capacidad de solubilización de fósforo por cepas de *Azotobacter vinelandii* modificadas genéticamente. En el presente estudio las cepas de *Azotobacter vinelandii* nativas de la rizósfera de *Ipomoea batatas* fueron capaces de solubilizar roca fosfórica alcanzando un valor de ortofosfatos de 20,71 ppm por la cepa IBVS13 aislada del Valle del Sinú, considerándose un reporte significativo para esta especie.

Bacterias del genero *Azospirillum* al igual que de *Azotobacter* no se consideran buenas solubilizadoras de fósforo, sin embargo, existen reportes en los cuales

destacan la capacidad solubilizadoras de estas bacterias Rodríguez et al. (2004), reportaron por primera vez la producción de ácido glucónico y la solubilización directa de fosfato por cepas de *Azospirillum brasilense*, en el mismo sentido Ratti et al. (2001), entre sus resultados indican que existe una respuesta de actividad fosfatasa ácida, de la bacteria *Azospirillum brasilense*, a la adición de fosfato tricálcico que indican la capacidad solubilizadoras de estas bacterias. En esta investigación con la cepa de *Azospirillum brasilense* (IBVC76) aislada del Valle del Cesar se alcanzó un valor de 19,58 ppm de ortofosfato disponible, confirmando la capacidad de solubilización de fósforo de esta cepa.

La producción de índoles por las bacterias aisladas de la rizósfera de batata en diferentes regiones del Caribe Colombiano está en el rango de 7 a 138 µg.mL⁻¹, resultados que están por encima de los reportados por Yasmin, et al (2010) de 4,97 - 46,66 µg.mL⁻¹ y Dawwam et al. (2013) de 0,6 a 10,73 µg.mL⁻¹ en bacterias aisladas de la rizósfera de batata. La cepa con la mayor producción de índoles es la bacteria *Azotobacter chroococcum* (IBVC69) con 138,75 µg.mL⁻¹, seguida de la bacteria *Azotobacter vinelandii* (IBVC74) con 65,60 µg.mL⁻¹ y *Azospirillum brasilense* IBVC76 con 65,08 µg.mL⁻¹ (tabla 3); todas aisladas de la zona del

Tabla 5. Efecto de la inoculación de bacterias aisladas de la rizósfera de batata de la región Caribe en plántulas de batata en casa de malla.

Zona	Cepa	Identificación	Altura (cm)	Longitud Radicular (cm)	Peso seco Aéreo (mg)	Peso seco Radicular (mg)
Montes de María	Control	Sin Inoculación	16,49±3,8 a	34,45±5,2 b	559,2±112,5 a	358,4±105,7 b
	IBCB15	<i>Azotobacter vinelandii</i>	19,53±3,9 b	29,05±7,1 a	607,2± 204,1 a	393,8± 153,9 b
	IBCB10	<i>Azotobacter</i>	22,97± 4,2 c	32,63±8,1 ab	615,1± 40,8 a	246,4±61,20 a
Sabanas Colinadas	Control	Sin Inoculación	11,10±2,3 a	26,94± 4,7 a	328,2±85,8 a	292,1±80,8 b
	IBCR19	<i>Azotobacter chroococcum</i>	13,20±2,6 b	30,47±3,8 a	401,3±96,8 b	343,8±57,9 c
	IBSC7	<i>Azospirillum lipoferum</i>	12,23±0,7 ab	38,23±8,4 b	305,5±68,3 a	214,9±31,4 a
Valle del Cesar	Control	Sin Inoculación	19,54±3,8 a	24,62± 4,8 a	541,2±143,8 a	255,4±69,0 b
	IBVC74	<i>Azotobacter vinelandii</i>	23,67±4,4 b	24,94±3,6 ab	657,0±191,5 bc	381,0±75,8 d
	IBVC57	<i>Azotobacter vinelandii</i>	25,01±4,9 b	33,63±4,8 c	643,2±117,5 bc	248,3±60,9 b
	IBVC76	<i>Azospirillum brasilense</i>	19,11±2,7 a	28,82±5,7 b	597,3±89,4 ab	188,6±36,7 a
	IBVC69	<i>Azotobacter chroococcum</i>	33,84±3,2 c	37,27±8,7 c	733,3±78,4 c	302,0±52,7 bc
Valle del Sinú	Control	Sin Inoculación	41,25±9,3 a	21,87±2,4 a	1367,8±482,1 b	330,1±86,9 a
	IBVS2	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	59,57±1,6 b	26,27±2,7 b	1373,3±198,8 b	331,3±96,9 a
	IBVS13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	44,49±1,2 a	26,16±3,4 b	727,4±468,3 a	334,1±21,9 a

Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas según el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confiabilidad.

Valle del Cesar. Ahmad *et al.* (2005), han reportado la producción de índoles para bacterias del género *Azotobacter* en el rango de 7,30 - 32,80 µg mL⁻¹, valores inferiores a los obtenidos por las bacterias de *Azotobacter* en esta investigación, de igual forma Malhotra y Srivastava (2009) reportan que cepas de *Azospirillum brasilense* producen índoles en el rango de 20 - 25 µg mL⁻¹ inferiores a los obtenidos en esta investigación, resultados que perfilan a las bacterias obtenidas como potenciales productoras de índoles.

Los resultados obtenidos en el ensayo de reducción de acetileno indican que las cepas *Azotobacter vinelandii* (IBVC74), *Azospirillum brasilense* (IBVC76) y *Azospirillum lipoferum* (IBSC7) presentan una reducción estadísticamente significativa de acetileno con respecto al control (tabla 4), resultados que sugieren

que estas bacterias presentan la capacidad de fijación de nitrógeno característica ampliamente reportada para estas especies bacterianas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Faccini *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008; Yasmin *et al.*, 2010).

Evaluación de bacterias asociadas al cultivo de batata, capaces de promover el crecimiento vegetal en plántulas de *Ipomea batata* VAR.corpoica -15020063 en invernadero

Los resultados del efecto de la inoculación de bacterias en los parámetros de crecimiento altura de la parte aérea y radicular (cm), masa seca de la parte aérea y radicular (g) respecto al tratamiento control en invernadero se resumen en la tabla 5.

Los resultados indican que asociada a la rizósfera de cultivos de *Ipomoea batatas* en todas las zonas muestreadas se encuentran bacterias nativas capaces de promover el crecimiento vegetal en invernadero. Las bacterias *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* han sido reportadas como promotoras de crecimiento vegetal en plantas tuberosas obteniendo incrementos en los parámetros de crecimiento como materia seca, longitud radical y altura (Mahendran *et al.*, 1996; Farzana y Radizah, 2005; Dawwam *et al.*, 2013), resultados similares a los obtenidos en esta investigación para la zona de Sabanas Colinadas en donde la longitud radical presentó un incremento significativo de 42% con la inoculación de *Azospirillum lipoferum* (IBSC7) (tabla 5) y en la zona del valle del Cesar la longitud radical se incrementó en un 17% con la bacteria *Azospirillum brasilense* (IBVC76) (tabla 5).

Los resultados obtenidos con la bacteria *Azotobacter chroococcum* indican que para la zona de Sabanas Colinadas con la inoculación de la bacteria *Azotobacter chroococcum* (IBCR19) se observa un incremento estadísticamente significativo en la altura (18%), peso seco aéreo (22%) y peso radicular (17%) de plántulas de *Ipomoea batatas* respecto al control sin inoculación. En Valle del Cesar se logró un incremento significativo en la altura (73%), longitud radical (51%) y peso seco de la parte aérea (35%) con la inoculación de la bacteria *Azotobacter chroococcum* (IBVC69) (tabla 5), resultados similares fueron obtenidos por Alarcón *et al.* (2008), quienes reportaron un incremento en el rendimiento de tubérculos de batata con la inoculación de *Azotobacter chroococcum*.

La bacteria *Azotobacter vinelandii* ha sido reportada como promotora de crecimiento vegetal para diferentes tipos de cultivos como girasol (Shaukat *et al.*, 2006), tomate (Sánchez *et al.*, 2012) y trigo (Aly *et al.*, 2012), los resultados de esta investigación sugieren que esta bacteria promueve el crecimiento en *Ipomea batatas*. Para la zona de los Montes de María con la inoculación de la bacteria *Azotobacter vinelandii* (IBCB10) se obtuvo un incremento significativo de 39% en la altura de las plántulas de batata respecto al control sin inoculación mientras que el peso seco radicular se incrementó cerca de un 10% con la inocula-

ción de la bacteria *Azotobacter vinelandii* (IBCB15) (tabla 5). Para el Valle del Cesar se alcanzó un incremento de 49% en el peso seco radicular con *Azotobacter vinelandii* (IBVC74) respecto al control sin inoculación (tabla 5).

La bacteria *Pseudomonas denitrificans* ha sido reportada para cultivos de trigo, maíz y tomate (Belimov *et al.*, 2001). En los resultados obtenidos en esta investigación para el Valle del Sinú tanto la altura como la longitud radical de plántulas de *Ipomoea batatas* se incrementaron significativamente respecto al control sin inoculación en un 44% y 20% respectivamente con la bacteria *Pseudomonas denitrificans* (IBVS2) (tabla 5).

Las bacterias aisladas de la rizósfera de batata en las diferentes regiones del Caribe Colombiano presentaron características de microorganismos promotores de crecimiento vegetal y demostraron ser eficientes en invernadero en plántulas de *Ipomoea batatas*, incrementando los parámetros de crecimiento respecto al control sin inoculación. Estas bacterias se perfilan como potenciales componentes de bioestimulantes puesto que favorecen la circulación de nutrientes en las plantas y permiten reducir la necesidad del uso de fertilizantes de síntesis química (Sureshbabu *et al.*, 2016), logrando en consecuencia mejorar la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos.

Conclusiones

Se seleccionaron 10 cepas bacterianas asociadas al cultivo de batata pertenecientes las zonas Montes de María, Sabanas Colinadas, Valle del Cesar y Valle del Sinú; las cuales pertenecen a las especies bacterianas *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas denitrificans*.

Las bacterias seleccionadas tienen múltiples actividades como PGPR todas las cepas seleccionadas se caracterizan por solubilizar fósforo y producir índoles. Solamente tres cepas bacterianas de las especies *Azospirillum lipoferum* IBSC7, *Azospirillum brasilense* IBVC76 y *Azotobacter vinelandii* IBVC74, fueron capaces de reducir acetileno, resultados que perfilan a

estas cepas bacterianas como potenciales bioestimulantes del cultivo de batata.

Asociada a la rizósfera de cultivo de *Ipomoea batatas* se encuentran bacterias nativas capaces de generar un incremento en parámetros de crecimiento como altura y longitud radical, peso seco aéreo y radical de plántulas de batata mantenidas en condiciones de invernadero.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombiano y al Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). A la PhD. Vera Lucia Divan Baldani, Investigadora de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA, por su valioso aporte en capacitación.

Referencias bibliográficas

Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, 29(1), 29-34.

Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M.S., (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Research in Microbiology*, 163(2), 173-181.

Alarcón, A. Z., Morales, J. A., Oliva, E. J., Vega, A. B., & Boicot, T. F. (2008). Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus* sp en el cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L), Lam). *Revista Electrónica Granma Ciencia*, 12 (2), 1-9.

Aly, M. M., El Sayed, H. E. A., & Jastaniah, S. D. (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. *Journal of American Science*, 8 (5), 667-676.

Belimov, A. A., Safronova, V. I., Sergeyeva, T. A., Egorova, T. N., Matveyeva, V. A., Tsyganov, V. E., & Dietz, K. J. (2001). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (7), 642-652.

Bergey, D.H & Holt J. G. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Nine edition. Baltimore: Williams &Wilkins. Philadelphia, USA. p. 787.

Carrillo, A., Puente, M., Castellanos, T., & Bashan, Y. (1998). Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. Manual de Laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, Colombia-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste La Paz, Baja California Sur, México, 51p.

Dahllof, I., Baillie, H., & Kjelleberg, S. (2000). rpoB-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (8), 3376-3380.

Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emara, H. M., Abbas, I. H., & Hassan, M. M. (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 58 (2), 195-201.

Döbereiner J., Baldani V.L.D., & Baldani, J.I. (1995). Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas ñaolegumino-sas. Brasília: EMBRAPA-SPI. Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB. p. 11-60.

Faccini, G., Garzon, S., Martinez, M., & Varela, A., (2007). Evaluation of the effect of a dual inoculum of phosphate-solubilizing bacteria and *Azotobacter chroococcum*, in crops of creole potato (papa criolla), yema de huevo variety (*Solanum phureja*). *First International Meeting on Microbial*

- Phosphate Solubilization*. Springer Netherlands p.301–308.
- Farzana, Y., & Radizah, O. (2005). Influence of rhizobacterial inoculation on growth of the sweet potato cultivar. *On Line Journal of Biological Science*, 1(Suppl 3), 176-179.
- Fenglerowa, W. (1965). Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. *Acta Microbiológica Polonica*, 14 (2), 203-206.
- Fiske, C., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2),375-400
- Ghyselinc, J., Velivelli, S. L., Heylen, K., O’Herlihy, E., Franco, J., Rojas, M, Vosa, P., & Prestwich, B. D. (2013). Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. *Systematic and applied microbiology*, 36 (2),116-127.
- Glickman, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796.
- Guang-Can, T. A. O., Shu-Jun, T. I. A. N., Miao-Ying, C. A. I., & Guang-Hui, X. I. E. (2008). Phosphate-solubilizing and-mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, 18 (4), 515-523.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., & Jackson, E.K., (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation-laboratory and field evaluation. *Plant physiology*, 43 (8), 1185 -1207
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1), 48-58.
- Kumar, V., & Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*, 28 (3), 301-305.
- Mahendran, P.P., Kumar, N., & Saraswathy, S., (1996). Studies on the effect of biofertilizers on potato (*Solanum tuberosum*). *South Indian Horticulture*, 44 (3-4): 79-82.
- Malhotra, M. & Srivastava, S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 45 (1), 73-80.
- Marques, J. M., da Silva, T. F., Vollú, R. E., de Lacerda, J. R. M., Blank, A. F., Smalla, K., & Seldin, L. (2015). Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage. *Applied Soil Ecology*, 96(1), 273-281.
- Park, J., Bolan, N., Mallavarapu, M., & Naidu, R., (2010). Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria. In: 19th *World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World Brisbane*, 1005(66), 1-6.
- Ratti, N., Kumar, S., Verma, H. N., & Gautam, S. P. (2001). Improvement in bioavailability of *tricalcium phosphate* to *Cymbopogon martinii* var. *motia* by rhizobacteria, AMF and *Azospirillum* inoculation. *Microbiological research*, 156 (2), 145-149.
- Rodríguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., & Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91 (11), 552-555.
- Rokhbakhsh-Zamin, F., Sachdev, D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A., Pardesi, K.R., Zinjarde, S., Dhakephalkar, P.K., & Chopade, B.A., (2011). Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6), 556-566.

- Sánchez, D., Gómez, R., Garrido, M., & Bonilla, R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3 (7), 1401-1415.
- Sánchez López, D. B., Pérez Pazos, J. V., Hinestroza, D., & Adriana, H. (2016). Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18 (1), 65-72.
- Santos, J.F., Oliveira, A.P., Alves, A.U., Dornelas, C.S.M., Brito, C.H., & Nóbrega, J.P.R., (2006). Produção de batata-doce adubada com esterco bovino em solo com baixa teor de matéria orgânica. *Horticultura Brasileira*, 24(1), 103-106.
- Sashidhar, B., & Podile, A. R. (2009). Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. *Microbial biotechnology*, 2 (4), 521-529.
- Selvakumar, G., Reetha, S., & Thamizhiniyan, P. (2012). Response of biofertilizers on growth, yield attributes and associated protein profiling changes of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). *World Applied Sciences Journal*, 16 (10), 1368-1374.
- Shank, E., Klepac, V., Collado, L., Powers, G., Losick, R., & Kolter, R. 2011. Interspecies interactions that result in *Bacillus subtilis* forming biofilms are mediated mainly by members of its own genus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (48): E1236-E1243.
- Shaukat, K., Afrasayab, S., & Hasnain, S. (2006). Growth responses of *Helianthus annuus* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizers. *International Journal of Agricultural Research*, 1(6), 573-581.
- Singh, U.N., (2013). Effect of bio-fertilizers on yield and economic traits of potato at two fertility levels. *HortFlora Research Spectrum*, 2(3), 262-264.
- Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini A, Costa P.B., Meyer J., Vargas L. K., Schoenfeld R., & Passaglia L. M. P. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and Soil*, 366(1-2), 585-603.
- Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24 (4), 487-506.
- Sureshbabu, K., Amaresan, N., & Kumar, K. (2016). Amazing Multiple Function Properties of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(2), 661-683.
- Yasmin, F., Othman, R., Sijam, K., & Saad, M. S. (2010). Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (11), 815-821.