

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
OFICINA DE INVESTIGACIÓN
CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2015



INFORME FINAL

**“AISLAMIENTO DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS DIAZOTRÓFICAS
DE CULTIVADORES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) CON POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO EN LA REGIÓN SAN MARTÍN”**

PRESENTADO POR EL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Investigador Responsable:

Blgo. M. Sc. Dr. Winston Franz Ríos Ruiz

Investigador Co-responsable:

Ing. M. Sc. Dr. Agustín Cerna Mendoza

Investigadores Colaboradores:

Ing. Alfredo Ramos Perea

Mblgo. M. Sc. Renzo Alfredo Valdez Núñez

Personal Técnico:

Bach. Jean Francis Saavedra Cárdenas

Tarapoto - Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN – TARAPOTO

OFICINA DE INVESTIGACIÓN

CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2015



INFORME FINAL

**“AISLAMIENTO DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS DIAZOTRÓFICAS DE
CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
EN LA REGIÓN SAN MARTÍN”**

PRESENTADO POR EL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Investigador Responsable:

Blgo. M. Sc. Dr. Winston Franz Ríos Ruiz

Investigador Co-responsable:

Ing. M. Sc. Dr. Agustín Cerna Mendoza

Investigadores Colaboradores:

Ing. Alfredo Ramos Perea

Mblgo. M. Sc. Renzo Alfredo Valdez Núñez

Personal técnico:

Bach. Jean Francis Saavedra Cárdenas

Tarapoto – Perú

2016

Dedicatoria

A mi esposa Beatriz, a mi hija Natalie y a mi hijo Franz, motivos de superación en mi vida.

Winston Franz Ríos Ruiz

A mi esposa e hijas, como testimonio de mi amor y cariño.

Agustín Cerna Mendoza

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, por el aporte financiero para el desarrollo de la presente investigación.

A todas y cada una de las personas que hicieron posible la ejecución del presente trabajo.

Índice

	Pág.
Lista de figuras	5
Lista de tablas	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Elección de las zonas de muestreo	13
2.2. Muestreo y transporte de raíces y suelos	13
2.3. Aislamiento de bacterias rizosféricas diazotróficas de la rizósfera de cultivares de arroz	14
2.4. Purificación, mantenimiento y conservación de aislamientos diazotróficos.....	16
2.5. Evaluación de las características fenotípicas y morfológicas de aislamientos diazotróficos.....	16
2.6. Determinación de las características de promoción de crecimiento vegetal.....	16
2.6.1. Determinación de la producción de compuestos indólicos (AIA, ácido indol acético).....	16
2.6.2. Determinación de proteína	17
2.6.3. Evaluación de la solubilización de fosfatos.....	18
2.6.4. Evaluación del antagonismo y antibiosis contra <i>Rhizoctonia solanii</i> y <i>Rhizoctonia oryzae sativae</i>	18
2.6.4.1. Método para evaluar antibiosis	18
2.6.4.2. Método para evaluar antagonismo	19
2.7. Análisis estadísticos.....	20
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Colecta y análisis físico y químico de suelos	21
3.2. Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas	22
3.3. Producción de compuestos indólicos (AIA, ácido indol acético)	29
3.4. Solubilización de fosfato tricálcico insoluble	32

3.5. Ensayo de actividad antifúngica	35
IV. CONCLUSIONES	44
V. RECOMENDACIONES	45
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	46

Lista de figuras

	Pag.
Figura 1. Localización de sitios de muestreo en la región San Martín.....	13
Figura 2. Trabajo de colecta y aislamiento	15
Figura 3. Primer plano de la morfología de colonias de bacterias aisladas de la rizósfera de arroz, creciendo en agar Burk y MJ, ambos carentes de nitrógeno combinado	22
Figura 4. Morfología bacteriana (tinción de Gram) y detalle de colonias de cepas diazotróficas aisladas de rizósfera de arroz en medio Burk	23
Figura 5. Morfología bacteriana (tinción de Gram) y detalle de colonias de cepas diazotróficas aisladas de rizósfera de arroz en medio MJV.....	24
Figura 6. Evaluación de la producción de AIA en medio de cultivo sin suplementar y suplementado con 600 mg de L-triptófano L ⁻¹	29
Figura 7. Ensayo de solubilización de fosfato en medio LB suplementado con 0,1% de fosfato tricálcico.....	32
Figura 8. Evaluación del antagonismo de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz, contra cepa de <i>Rhizoctonia solanii</i>	36
Figura 9. Evaluación del antagonismo de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz, contra cepa de <i>Rhizoctonia oryzae sativae</i>	36
Figura 10. Evaluación de la antibiosis de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz contra la cepa de <i>Rhizoctonia solanii</i>	37
Figura 11. Evaluación de la antibiosis de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz, contra la cepa de <i>Rhizoctonia oryzae sativae</i>	38
Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros evaluados en las cepas de bacterias rizosféricas diazotróficas	43

Lista de tablas

	Pag.
Tabla 1: Diferentes modos de acción de las PGPR para promover crecimiento	10
Tabla 2: Ubicación geográfica y análisis fisicoquímicos de suelos cultivados con arroz en la región San Martín.....	21
Tabla 3: Características de aislamientos diazotróficos rizosféricos aislados de 2 suelos procedentes de la región San Martín.....	26
Tabla 4: Evaluación de la producción de ácido 3-indol acético (AIA) en condiciones en medio TSB suplementado con 600 mg L-triptófano L ⁻¹ (TSB + T) y sin suplementar (TSB – T).....	30
Tabla 5. Eficiencia de la solubilización de fosfato tricálcico insoluble a los 4, 8 y 12 días después de la inoculación de cepas diazotróficas rizosféricas en medio LB suplementado con 0,1% de fosfato tricálcico insoluble.....	33
Tabla 6. Evaluación del efecto fungicida a través de antagonismo y antibiosis, de cepas fitopatógenas de <i>Rhizoctonia solanii</i> y <i>Rhizoctonia oryzae sativae</i> por bacterias diazotróficas rizosféricas. Las letras en mayúscula representan las diferencias significativas entre cepas y las letras minúsculas significan diferencias significativas de una misma cepa en los diversos tratamientos experimentales.....	39
Tabla 7. Cargas factoriales (F1, F2, F3 y F4) de la evaluación de la producción basal de AIA (AIA –Tryp), producción potencial de AIA (AIA +Tryp), solubilización de fosfato a los 12 días (Sol P), evaluación del antagonismo contra <i>R. solanii</i> (Antg RS), evaluación del antagonismo contra <i>R. oryzae-sativae</i> (Antg RO), evaluación de la antibiosis contra <i>R. solanii</i> (Antb RS) y evaluación de la antibiosis contra <i>R. oryzae-sativae</i> (Antb RO), como resultado del análisis de componentes principales (PCA)	42

RESUMEN

El arroz alimenta a más del 50% de la población a nivel mundial, constituyendo un gran aporte energético en familias de bajos ingresos. En el Perú, la región San Martín se constituye como el primer productor de arroz con una superficie de 82 271 ha produciendo 559 829 TN con un rendimiento promedio de 6,8 TN/ha. Año tras año, el abuso de fertilizantes químicos sintéticos (N, P y K) se hace necesario para mantener altos niveles de rendimiento, esto ocasiona alteración en la calidad física, química y biológica de los suelos. Una alternativa sostenible constituye la utilización de microorganismos benéficos seleccionados a través de sus características de promoción de crecimiento vegetal. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar bacterias rizosféricas de arroz de las zonas de Cacatachi y Picota en la región San Martín, además de seleccionar y evaluar las principales características de crecimiento vegetal. 60 cepas fueron seleccionadas por diazotrofia, creciendo en medio Burk y MJV, caracterizadas y luego evaluadas. Un análisis de componentes principales evidencia que existen 4 variables que permiten explicar la varianza en los resultados. Las cepas p7b1m, la2b2, la3c5m, p2b1m, p9b3m, la2b3, la3c3, la5c5, tuvieron la máxima contribución a la varianza total. De este análisis se deduce que la evaluación a nivel de invernadero permitirá seleccionar aquellas cepas que de manera individual o en conjunto pueden ser utilizadas como biofertilizantes y bioprotectores para mejorar el rendimiento del cultivo de arroz, con dosis menores de fertilizantes químicos.

Palabras clave: Rizósfera, Solubilización de fosfatos, ácido indol acético, arroz.

ABSTRACT

Rice feeds more than 50% of the population worldwide, constituting a large energy input in low-income families. In Peru, the San Martin region was established as the first producer of rice with an area of 82 271 has produced 559 829 has with an average yield of 6.8 TN / ha. Year after year, the abuse of synthetic chemical fertilizers (N, P and K) is necessary to maintain high levels of grain yield, this causes alteration in the physical, chemical and biological soil quality. A sustainable alternative is the use of beneficial microorganisms with selected characteristics through his promotion of plant growth, this are called PGPRs (Plant Growth Promotore Rhizobacteria). The aim of the study was to isolate and characterize bacteria rice rhizosphere of Cacatachi and Picota zones in the region of San Martin, in addition to select and evaluate the main characteristics of plant growth. 60 strains were selected by diazotrofia, growing in Burk and MJV medium, characterized and then evaluated. A principal component analysis shows that there are 4 variables that explain the variance in the results. p7b1m, la2b2, la3c5m, p2b1m, p9b3m, la2b3, la3c3 and la5c5 strains had the highest contribution to the total variance. This analysis shows that to level of greenhouse evaluation will allow selecting those strains, which individually or collectively can be used as bio-fertilizers and bioprotectors to improve crop yield of rice, with lower doses of chemical fertilizers.

Keywords: Rhizosphere, phosphate solubilization, acetic acid indole, rice.

I. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una excelente fuente de carbohidratos y proteínas y es considerado por la FAO como un cultivo estratégico para la seguridad alimentaria y la población mundial debido a su amplia distribución de suelos y climas (IRRI, 2016). La mitad de la población mundial consume arroz como cereal primario (Cottyn et al., 2001) y su demanda se correlaciona con el aumento de la población (Kantachote et al., 2016). Se estima que la producción mundial de arroz para el periodo 2015/2016 será de 469,5 millones de TN (USDA, 2016).

Para mantener y/o elevar su productividad, el agricultor utiliza altos niveles de fertilizantes químicos, particularmente fertilizantes nitrogenados. Esta práctica incrementa los costos de producción, al mismo tiempo ocasiona reducción de la fertilidad de los suelos y contaminación de fuentes hídricas por nitratos (Díaz y Rosenberg, 2008). Además, el uso excesivo de agroquímicos en los campos de cultivo ocasiona la resistencia de patógenos, así como problemas ambientales y de salud debido a la acumulación de sustancias xenobióticas (Rawat et al., 2012), reduciendo su productividad (Mishra et al., 2014; Habib et al., 2016).

En el Perú, el cultivo de arroz constituye el motor de la economía de varios departamentos y constituye el primer producto en área sembrada y cosechada (INIA, 2016) y se estima un crecimiento del 6,4% a nivel nacional para el 2016. En la región selva se concentra el 42,8% de la producción nacional de arroz, gran parte en sistema inundado (MINAGRI, 2012). San Martín es el primer productor a nivel nacional, con una superficie de 82 271 ha y una producción de 559 829 TN con un rendimiento promedio de 6,8 TN/ha (SIEA, 2016) representando el 22,4% de la producción nacional para el año 2014 (BCRP, 2015).

Hoy en día, hacer agricultura sostenible, es posible. Sistemas alternativos para la reposición de nutrientes se encuentran al alcance del agricultor, entre los que figura el compost, los bioles y los bio-inoculantes. Los bio-inoculantes son los más atractivos debido a su impacto positivo tanto en la planta como en la salud del suelo (Kantachote et al., 2016). Se definen como productos que contienen microorganismos del suelo, en estado de latencia o activos, y promocionan el crecimiento de las plantas (Paul et al., 2013). Estos microorganismos han tomado la

denominación de PGPR (Plant Growth Promotore Rhizobacteria), y de acuerdo a su modo de acción pueden tomar diferentes denominaciones (Tabla 1) (Bishnoi, 2015).

Tabla 1. Diferentes modos de acción de los PGPR para promover crecimiento.

DENOMINACIÓN	DEFINICIÓN	MECANISMO	REFERENCIAS
Biofertilizante	Producto que contiene microorganismos vivos que al ser aplicados a la semilla, planta o suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento a través de la captación y mejora en la viabilidad de nutrientes primarios a la planta huésped.	<ul style="list-style-type: none"> • Fijación biológica de Nitrógeno. • Solubilización de fosfatos insolubles. • Solubilización de micronutrientes (Zn). 	<ul style="list-style-type: none"> • Somers, Vanderleyden and Remans, 2004. • Fuentes-Ramírez and Caballero-Mellado, 2005. • Shakeel et al., 2015.
Fitoestimulante	Microorganismos con la habilidad de producir o cambiar la concentración de reguladores del crecimiento tales como AIA, GA, citoquininas y etileno.	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y ácido giberélico). • Producción de ACC desaminasa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lugtenberg et al. 2004 • Glick et al., 2012
Biopesticida	Microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas a través del control de agentes Fito patogénicos, principalmente por la producción de antibióticos y metabolitos anti fúngicos.	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de antibióticos. • Producción de HCN • Producción de enzimas hidrolíticas. • Exclusión competitiva. • Inducción de Resistencia Sistémica adquirida (RSA) e Inducida (RSI). 	<ul style="list-style-type: none"> • Vessey et al., 2003. • Matinez-Viveros et al., 2010. • Chandler et al., 2008.

El Nitrógeno es el nutriente más limitante para el cultivo de arroz (Dawe et al., 2000), y es usado por la planta para sintetizar proteínas y ácidos nucleicos. A pesar de ello solo la tercera parte del nitrógeno aplicado es utilizado por la planta, la otra tercera parte es retenida en el suelo y el resto se pierde a la atmósfera a través de la volatilización del amonio (Buresh et al., 2008). La Fijación biológica de nitrógeno (FBN), es de gran importancia dentro del cultivo de arroz. Los fijadores de nitrógeno se llaman "diazotróficos" y juegan un rol importante en el ecosistema debido a que reducen el nitrógeno atmosférico N_2 a amoniaco (NH_3), haciéndolo viable a la planta

(Dilworth, 1974). La FBN representa un beneficio económico y ambiental en la agricultura tropical debido a que puede reemplazar altos niveles de fertilización química nitrogenada (Adesemoye, Torbert y Kloepper, 2009).

Al igual que el nitrógeno, el fósforo (P), es un elemento limitante para el rendimiento del cultivo de arroz en suelos tropicales debido a su dinámica compleja (da Costa et al., 2015). Los fertilizantes fosfatados al ser incorporados al suelo, son rápidamente adsorbidos y precipitados por componentes del suelo, por lo que es necesario aplicar altas dosis para obtener rendimientos satisfactorios (Novais y Smith, 1999). Como alternativa a este proceso, existe la solubilización de fosfatos insolubles mediada por microorganismos (bacterias y hongos) (Marra et al., 2011). Se ha demostrado que la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato mejora la captación de fósforo en la planta, minimizando la aplicación externa de fertilizantes fosfatados al suelo (Bishnoi et al., 2015; Ramírez-Bahena et al., 2016).

Las fitohormonas son compuestos orgánicos que en bajas concentraciones influyen los procesos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en las plantas (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Las PGPR pueden estimular la producción de fitohormonas o biosintetizarlas (Spaepen, Vanderleyden y Remans, 2007). La producción de compuestos indólicos tipo auxina (AIA) como metabolitos secundarios es común por parte de los microorganismos rizosféricos. Las funciones del AIA bacteriano en la planta huésped son: a) Contribuye a evitar la respuesta de defensa del huésped, b) Mejora la interacción planta-microorganismo, c) Mejora la colonización de otros microorganismos al incrementar el sistema radical, d) Incrementa la diversidad en cantidad y calidad de los microorganismos rizosféricos al aumentar la cantidad de exudados radicales, e) Estimula la sobreproducción de pelos radicales y raíces laterales (Etesami, Alikhani y Hosseini, 2015).

Los microorganismos fitopatógenos son causantes de la pérdida de la tercera parte del rendimiento en los cultivos a nivel mundial (Agrios, 2005). Los PGPR pueden interactuar indirectamente a promover el crecimiento de la planta, a través de la actividad anti fúngica. Actuando como controladores biológicos y reduciendo la incidencia o severidad de las enfermedades de la planta (Adame-García, Luna Rodríguez y Iglesias-Andreu, 2016). Varios mecanismos están involucrados en el biocontrol de fitopatógenos tales como antagonismo directo vía producción de antibióticos, sideróforos, HCN, enzimas hidrolíticas (quitinasas, proteasas, lipasas,

celulasas), o por mecanismos indirectos donde el PGPR se comporta como un probiótico compitiendo con el fitopatógeno por un nicho (Lugtenberg y Kamilova et al., 2009).

El uso de biofertilizantes en arroz, en América Latina se encuentra aun pobremente estudiado. Los principales estudios han sido llevados a cabo en Brasil, donde ya existe una tecnología de inoculantes usando bacterias PGPR (Baldani et al., 2000; Ferreira, Baldani, 2010; Araujo et al., 2013). Actualmente los biofertilizantes dirigidos a arroz, buscan seleccionar microorganismos que fijan nitrógeno atmosférico (Nico et al., 2012, Habib et al., 2016) produzcan AIA (Phetcharat y Duangpaeng, 2012; Ji et al., 2014; Etesami, Alikhani y Hosseini, 2015; Habib et al., 2016), sideróforos (Ji et al., 2014; Etesami, Alikhani y Hosseini, 2015), con actividad ACC desaminasa (Etesami, Alikhani y Hosseini, 2015), solubilicen fosfatos insolubles (Nico et al., 2012; Ji et al., 2014; Etesami, da Costa et al., 2015; Alikhani y Hosseini, 2015, Habib et al., 2016) y de micronutrientes como el Zn (Shakeel et al., 2015), producción de ácido 5-aminolevulinico (Nunkaew et al., 2015, Kantachote et al., 2016) y que tengan propiedades biopesticidas (Ji et al., 2014; Chung et al., 2015; Habib et al., 2016).

Debido al escaso conocimiento sobre las interacciones de bacterias PGPR y cultivares de arroz en la región San Martín, el objetivo del presente proyecto fue aislar bacterias diazotróficas de la rizósfera de arroz con capacidad de promover el crecimiento de cultivares regionales de arroz, a fin de reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados en suelos de la región San Martín. Así, los aislamientos fueron purificados y caracterizados morfológica y bioquímicamente, además fueron caracterizados de acuerdo a características funcionales asociados con la promoción de crecimiento del arroz y propiedades antagonistas y de antibiosis con hongos fitopatógenos de importancia.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Elección de las zonas de muestreo

Las zonas de muestreo elegidas para el estudio fueron el distrito de Cacatachi, Provincia de San Martín, ubicada a una Latitud Sur de $6^{\circ} 28' 8,63''$ y a una Longitud Oeste de $76^{\circ} 26' 32,29''$ con una altitud de 284 msnm y el distrito de Picota, Provincia de Picota, ubicada a una Latitud Sur de $6^{\circ} 55' 24,9''$ y a una Longitud Oeste de $76^{\circ} 21' 43,6''$ con una altitud de 196 msnm. Ambas áreas fueron elegidas por su elevada producción de arroz en la región San Martín (Figura 1).

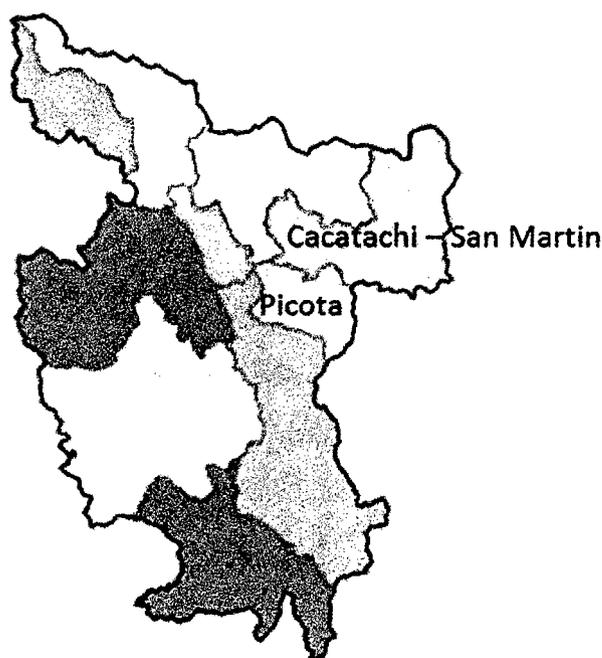


Figura 1: Localización de sitios de muestreo en la región San Martín.

2.2. Muestreo y transporte de raíces y suelos

Las muestras de suelo se tomaron en zigzag de campos de arroz para análisis fisicoquímicos, siguiendo la metodología propuesta por Soil Survey Staff (2009). Se tomaron 10 sub muestras de cada lugar y se procedió a homogenizar para tomar una muestra representativa. En cada zona se muestrearon 6 plantas vigorosas y sanas de los cultivares La Esperanza, La conquista y Capirona, antes de la etapa de floración. Fue separada la parte aérea de la radicular, donde las raíces fueron lavadas ligeramente para evitar el desprendimiento de suelo rizosféricos y luego transportadas en bolsas de polipropileno al laboratorio de Microbiología de la

Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSM-Tarapoto, a 4°C en un envase isotérmico de acuerdo a la metodología de Pramer y Schmidt (1966). Las muestras fueron analizadas en las 24 horas siguientes después de la colecta.

2.3. Aislamiento de bacterias rizosféricas diazotróficas de la rizósfera de cultivares de arroz

Los aislamientos bacterianos se realizaron a partir de suelo rizosférico adherido a las raíces de las 3 variedades de arroz indicadas anteriormente y cultivados bajo el sistema tradicional de trasplantes.

La metodología descrita a seguir, fue la utilizada por Dobereiner et al. (1995):

- Lavar las raíces en agua destilada y con ayuda de una tijera cortar las raíces en trozos de aproximadamente 0,5 cm y secarlas con papel de filtro.
- Pesar 0,2 g de raíces y colocarlas con unas pinzas en microtubos de 1,5 ml. Preparar 3 repeticiones como mínimo.
- Adicionar a cada microtubo, 1 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,9%). Agitar con Vórtex durante 20 s para desprender el suelo rizosférico.
- Centrifugar a 2000 r.p.m. Recoger el sobrenadante en 1 ml de solución salina estéril.
- Inocular 100 y 200 µl de la suspensión en tubos falcón de 50 ml rellenos hasta los 2/3 de su volumen con medio de cultivo semisólido MJV y Burk, ambos medios son libres de nitrógeno combinado. Cerrar los frascos herméticamente.
- Incubar los tubos Falcon a 30 °C hasta la aparición de una película de cultivo bacteriano. El crecimiento es claramente visible a los 40-45 días de incubación.
- Retirar con una espátula estéril, la parte superior del medio de cultivo.
- Tomar la capa bacteriana crecida en las tres cuartas partes del tubo y depositarla en tubos Falcon de 50 ml de capacidad.
- Adicionar solución salina estéril a cada tubo Falcon y homogenizar la muestra agitando mediante Vórtex durante 1 min.
- Añadir solución salina estéril cuando sea necesaria para favorecer la ruptura del medio de cultivo.
- Preparar diluciones seriadas al décimo en solución salina hasta la dilución 10^{-3} .

- Inocular placas de Petri que contienen el medio de cultivo adecuado con 100 μ l de cada una de las diluciones. Realizar, al menos, tres réplicas por dilución y medio de cultivo.
- Incubar las placas a 30 °C hasta la aparición de unidades formadoras de colonias (UFCs).

La Figura 2 muestra las etapas del proceso de aislamiento de bacterias rizosféricas diazotróficas de cultivares de arroz.



Figura 2: Trabajo de colecta y aislamiento A) Campos de arroz en el distrito de Cacatachi. B) Primer plano de plantas de arroz var. La Esperanza C) Campos de arroz en el distrito de Picota. D) Colecta de muestras de arroz. E) Selección de plantas de arroz en campo F) Lavado de raíces de arroz G) Selección de raicillas para aislamiento de suelo rizosférico H) Raicillas de arroz en microtubo estéril. I) Re suspensión de raicillas en Solución Salina Fisiológica estéril para recuperación de suelo rizosférico. J, K) Inoculación en medio semi-sólido libre de nitrógeno e incubación. L) Evidencia de crecimiento de diazotróficos, formación de sub-película en el medio semi-sólido. M) Siembra de diluciones de diazotróficos crecidos en tubos Falcon. N) Evaluación de UFCs procedente de cada dilución para su posterior caracterización.

2.4. Purificación, mantenimiento y conservación de aislamientos diazotróficos

Las UFCs fueron seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas mediante observación al estereomicroscopio. Cada UFC seleccionada fue resembrada en el mismo medio de la que se aisló para comprobar su pureza. Después de su aislamiento, el medio rutinario para el cultivo bacteriano fue el medio TSA (Anexo 3). Se realizaron cultivos de trabajo mediante placas máster para conservación a corto plazo así como conservación a largo plazo en crioviales conteniendo una suspensión bacteriana y glicerol esterilizado al 50% (1:1).

2.5. Evaluación de las características fenotípicas y morfológicas de aislamientos diazotróficos

Para la caracterización fenotípica se consideró la tinción Gram para evaluar la forma individual y la agrupación. En las características coloniales se evaluó la forma, tamaño, borde, color y aspecto de la colonia. Las UFCs fueron seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas observadas en un estereoscopio. Cada UFC seleccionada fue resembrada en el mismo medio de la que se aisló para comprobar su pureza. Después de su aislamiento, el medio rutinario para el cultivo bacteriano fue el medio de TSA e incubado a 30°C por 24-72 horas.

2.6. Determinación de las características de promoción de crecimiento vegetal

Se evaluaron las características de promoción de crecimiento de plantas en todos los aislamientos, mediante ensayos in vitro.

2.6.1. Determinación de la producción de compuestos indólicos (AIA, ácido indol acético)

Se usó la metodología propuesta por Gravel et al. 2007:

- Las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo completo, TSB; como en medio de cultivo definido, Bergersen. En ambos casos, suplementados o no con DL-Triptófano (CDH Ltd., India) (600 mg/Litro). La presencia de triptófano determinó la producción natural o intrínseca de compuestos indólicos.
- Cada cepa fue cultivada individualmente, en 3 ml de medio de cultivo (TSB o Bergersen) durante 24 – 72 h horas a 30 °C en agitación continua a 170 r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica ($D.O_{600\text{ nm}}$) de 1,0.

- El cultivo se centrifugó a 5 000 r.p.m. por 10 minutos.
- Se tomó 1,0 ml del sobrenadante y fueron transferidos a un microtubo de 1,5 ml.
- El pellet celular fue conservado a -20 °C hasta la determinación de proteína mediante el método de Bradford.
- Se adicionó 1,0 ml de reactivo de Salkowski (Gordon y Weber, 1951) a cada tubo y se mezcló por inversión. Se prepararon 3 réplicas por ensayo.
- El contenido de la prueba fue trasvasado a tubos de ensayo e incubado durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. La aparición de diferentes colores y tonalidades que oscilan entre el color rosa pálido y el naranja oscuro fue indicativa de la producción de AIA.
- Se determinó la absorbancia a 535 nm, utilizando una mezcla de 1,0 ml del medio de cultivo correspondiente y 1,0 ml de reactivo de Salkowski como referencia.
- Para determinar las concentraciones de AIA producidas se realizó una curva patrón usando ácido 3-indol acético (CDH Ltd., India).

2.6.2. Determinación de proteína

Se ha utilizado el Kit de proteína de acuerdo al método de Bradford, Merck Millipore. Este método se empleó para determinar la concentración de proteína en células enteras, como se describe a continuación:

- Se tomaron alícuotas de 25 μ l de la suspensión celular y se adicionó 1 volumen de NaOH 1 N. Se agitó en Vórtex y se sometió a ebullición durante 20 min.
- La suspensión se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 5 min para eliminar los restos celulares.
- Se tomaron alícuotas de 50 μ l del sobrenadante y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 500 μ L.
- De la mezcla anterior, se tomaron alícuotas de 50 μ L y se completaron con agua destilada hasta un volumen final de 800 μ L. Cuando fue necesario se diluyeron o concentraron las muestras.
- Se adicionaron 200 μ l de reactivo de Bradford (Merck) y se agitó en Vórtex. La lectura se realizó entre 2 y 60 min después de iniciada la prueba.

- La concentración de proteína se calculó después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco que contenía 800 µl de agua y 200 µl del reactivo de Bradford.
- La concentración de proteína se calculó mediante interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con Seroalbúmina bovina (Biogenlab) y medida a una longitud de onda de 595 nm.

2.6.3. Evaluación de la solubilización de fosfatos

La metodología de solubilización de fosfatos se realizó en base al protocolo utilizado por Nautiyal (1999), cuyos pasos se describen a seguir:

- Las cepas fueron reactivadas en medio TSB y crecidas por 24 – 48 h a 28 °C a 120 rpm hasta alcanzar una D.O_{600 nm} de 1,0.
- Las placas de Petri conteniendo medio LB suplementado con 0,1 % de fosfato tricálcico, fueron servidas y secadas por espacio de 30 minutos en cámara de flujo laminar.
- Las cepas fueron inoculadas a razón de 5 µL de manera equidistante, empleando 4 evaluaciones por placa y luego incubadas a 30 °C.
- Las evaluaciones se realizaron a los 4, 8 y 12 días después de la inoculación.
- Las placas que mostraron actividad de solubilización de fosfatos tuvieron un halo transparente alrededor de la estría, el tamaño del halo fue evaluado para estimar el grado de solubilización de fosfato, mediante la eficiencia (E) en la solubilización bajo la siguiente fórmula:

$$E = (\text{Diámetro de Solubilización} / \text{diámetro de crecimiento colonia} \times 100)$$

2.6.4. Evaluación del antagonismo y antibiosis contra *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae sativae*

2.6.4.1. Método para evaluar antibiosis

- Los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae sativae* fueron cultivados en placas de Petri con medio de cultivo PDA para luego ser incubados durante 5 días a 30 °C. Se realizaron dos réplicas.

- Se cultivó cada rizobacteria de manera independiente, en 3 ml de medio de cultivo TSB durante 24 h a 30 °C, en agitación continua a 170 r.p.m. hasta alcanzar una suspensión de densidad óptica de 1,0.
- Las placas de Petri fueron servidas con medio PDA. Se extendió la suspensión bacteriana con ayuda de una espátula de Digralsky, esperando 5 min. Se realizaron tres réplicas.
- Con la ayuda de sacabocados estériles (Diámetro = 6 mm), se colocaron discos de micelio de *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae sativae* en el centro de cada placa. Se realizaron 3 repeticiones. Una placa control fue realizada sin la inoculación de cepas problema y el hongo fitopatógeno.
- Los cultivos se incubaron durante 5 d a 28 °C. El efecto anti fúngico de las rizobacterias fue identificado mediante la inhibición del diámetro del hongo fitopatógeno. Al finalizar se determinó el diámetro de crecimiento del micelio del hongo (mm). Para cuantificación se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de crecimiento: } (R1-R2/R1) * 100$$

Donde, R1 es el diámetro del micelio inhibido y R2 el diámetro del micelio control.

2.6.4.2. Método para evaluar antagonismo

- Las cepas de *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae sativae* fueron cultivadas en placas de Petri con medio de cultivo PDA.
- Al finalizar el crecimiento, se colocó un disco de agar (diámetro 6 mm) donde creció *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae sativae* en el medio de una placa de Petri con medio PDA. Se prepararon 3 réplicas.
- Las rizobacterias de forma independiente fueron cultivadas, en 3 ml de medio de cultivo TSB, durante 24 h a 30 °C, en agitación continua a 170 r.p.m. hasta alcanzar una D.O_{600 nm} de 1,0.
- Las rizobacterias fueron inoculadas a razón de 5 µL de cada cultivo en los tres extremos equidistantes del hongo, y un cuarto fue inoculado con el medio de cultivo a manera de control.
- Las placas se incubaron durante 5 d a 28 °C. Al finalizar la incubación, el efecto antagonista de las bacterias aisladas contra el hongo se confirmó por el

crecimiento del hongo y la aparición de un halo de antibiosis alrededor de la colonia bacteriana. Se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de crecimiento: } (R1-R2/R1) * 100$$

Donde, R1 es el radio máximo de la colonia del hongo fitopatógeno en la placa control y R2 el radio de la colonia fúngica opuesta a la colonia bacteriana.

2.7. Análisis estadísticos

En cada uno de los análisis se procedió a calcular la media y su correspondiente error estándar (ES). Además para evidenciar diferencias significativas se empleó el análisis ANOVA, y el análisis multivarianza t-test de Tukey ($P < 0,05$) y Duncan ($P < 0,05$), del paquete informático XLSTAT 2016.1 (Addinsoft, Francia). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para analizar las relaciones entre la producción basal de AIA, solubilización de fosfato y actividad de biocontrol. Se utilizó el paquete estadístico XLSTAT versión 2016.1 software (Addinsoft, Francia).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Colecta y análisis fisicoquímico de suelos

Los suelos donde provinieron las plantaciones de arroz son contrastantes en sus propiedades fisicoquímicas. Ambos suelos no presentan problemas de sales, un nivel medio de materia orgánica y una concentración normal de nitrógeno. En el suelo de Picota el pH es neutro y en Cacatachi es moderadamente ácido (Tabla 2).

Tabla 2: Ubicación geográfica y análisis fisicoquímicos de suelos cultivados con arroz en la región San Martín.

Ubicación geográfica		Picota	Cacatachi
Altitud		196 msnm	284 msnm
Latitud Sur		6° 55' 24,9''	6° 28' 8,63''
Longitud Oeste		76° 21' 43,6''	76° 26' 32,29''
Análisis fisicoquímicos		Picota	Cacatachi
Textura	% Arena	13,6	49
	% Arcilla	52,8	41,4
	% Limo	33,6	9,6
	Clase textural	Arcilla	Arcilla
pH		7,16	6,46
C.E (µS)		682	517,12
Materia orgánica (%)		3,45	3,12
% N		0,173	0,156
P (ppm)		15,63	9,36
K (ppm)		292,4	142,12
CIC		35,8	12,57
Ca ²⁺		32,15	10,23

Los suelos de las zonas muestreadas, poseen un rango de pH cercano a la neutralidad. Beneduzi et al. (2013) reportó que el pH y el porcentaje de arcilla en suelos cultivados con plantaciones de caña de azúcar, fueron los mayores factores que afectaron la diversidad de bacterias diazotróficas, mientras que la materia orgánica lo es en menor efecto. La caracterización de los aislamientos diazotróficos, acompañado de la morfología microscópica y la forma de la colonia, muestra una elevada diversidad. Fierer y Jackson (2006), consideró el pH como la característica del suelo más útil para predecir la riqueza y diversidad de los suelos. Existe una correlación directa entre la alcalinidad del suelo y la diversidad genética, es decir suelos con altos índices de diversidad, muestran pH altos.

3.2. Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas

La búsqueda y selección de microorganismos que promueven el crecimiento vegetal no solo es importante para una agricultura sustentable, también lo es para la salud del suelo y la salud humana (Bishnoi et al., 2015). Ciertos microorganismos tienen la facultad de fijar el nitrógeno atmosférico (N_2), el cual es reducido a amonio (NH_3) pudiendo ser aprovechado por la planta (Dawe et al., 2000). Estos microorganismos son llamados diazotróficos y se ha demostrado la capacidad de captación de nutrientes, tolerancia a estreses, producción de fitohormonas, solubilización de fosfato inorgánico y mejora en la promoción del crecimiento (Gururani et al., 2012).

Sesenta aislamientos de posibles diazotróficos fueron obtenidos usando dos medios de cultivo libre de nitrógeno combinado (Burk y MJV). Un mayor número de diazotróficos fue obtenido de suelos de picota creciendo en medio MJV (36,7%). En relación a la variedad de arroz, la mayor cantidad de aislados diazotróficos rizosféricos provino de la variedad La Esperanza (41%), seguido de La Conquista (11%) y finalmente de la variedad Capirona (8%). La proporción entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es de 51,7% y de 48,3% respectivamente. La gran mayoría de los aislamientos fueron de forma bacilar y con actividad catalasa, siendo variables en sus características morfológicas, como se observa en las Figuras 3, 4 y 5 y en la Tabla 3.



Figura 3. Primer plano de la morfología de colonias de bacterias aisladas de la rizósfera de arroz, creciendo en agar Burk y MJV.

En relación a la caracterización microscópica y morfológica se evidenció una elevada diversidad entre los aislamientos. Después del aislamiento, una adecuada caracterización morfológica, bioquímica y molecular es necesaria para la correcta

identificación de bacterias diazotróficas (Baldani et al., 2014). Los medios usados en la investigación fueron Burk (Wilson y Knight, 1952) y MJV (Baldani et al., 2000), permitió recuperar esta gran diversidad. Vessey et al. (2003), reportó el aislamiento de una gran diversidad de bacterias rizosféricas diazotróficas a partir de la rizósfera de importantes cultivos en suelos de Cheongju, Korea.

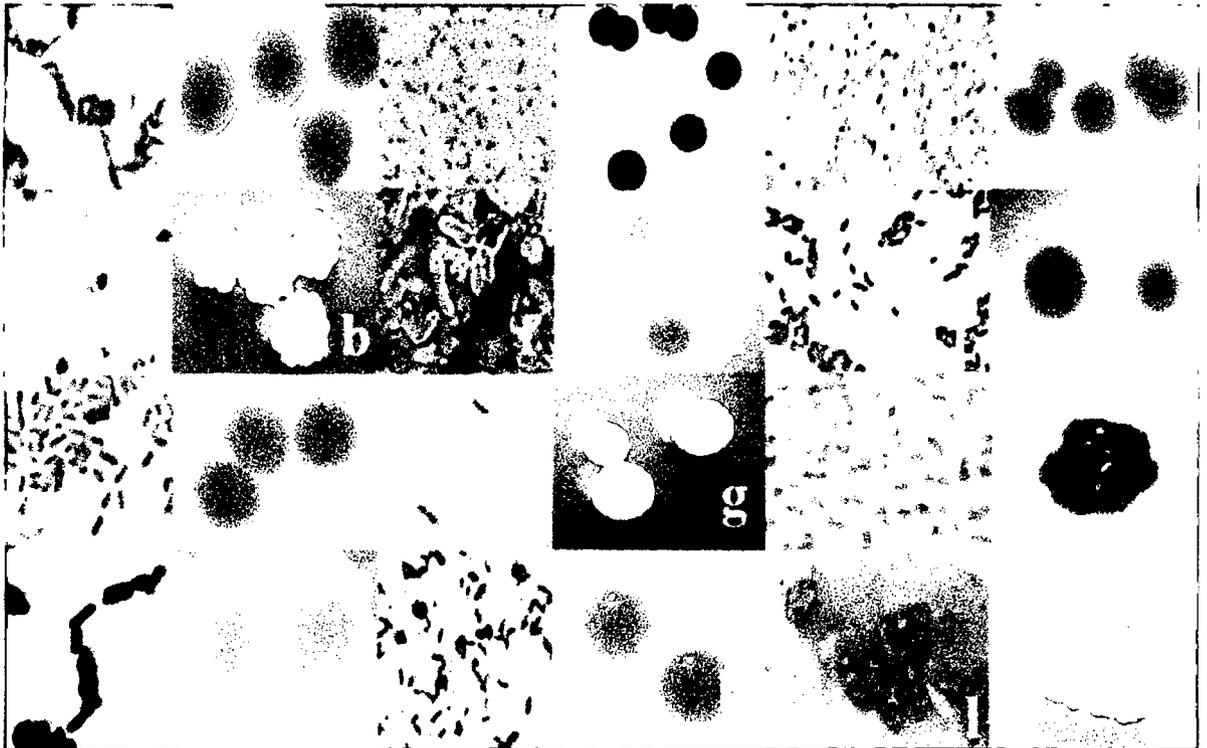


Figura 4. Morfología bacteriana (tinción de Gram) y detalle de colonias de cepas diazotróficas aisladas de rizósfera de arroz en medio Burk. A) La2b4; B) la2b1; C) la1a6; D) la3c5; E) la2b2; F) la1a5; G) la6c4; H) la5c2; I) la6c1; J) la5c1; K) la6c4 L) la5c5.

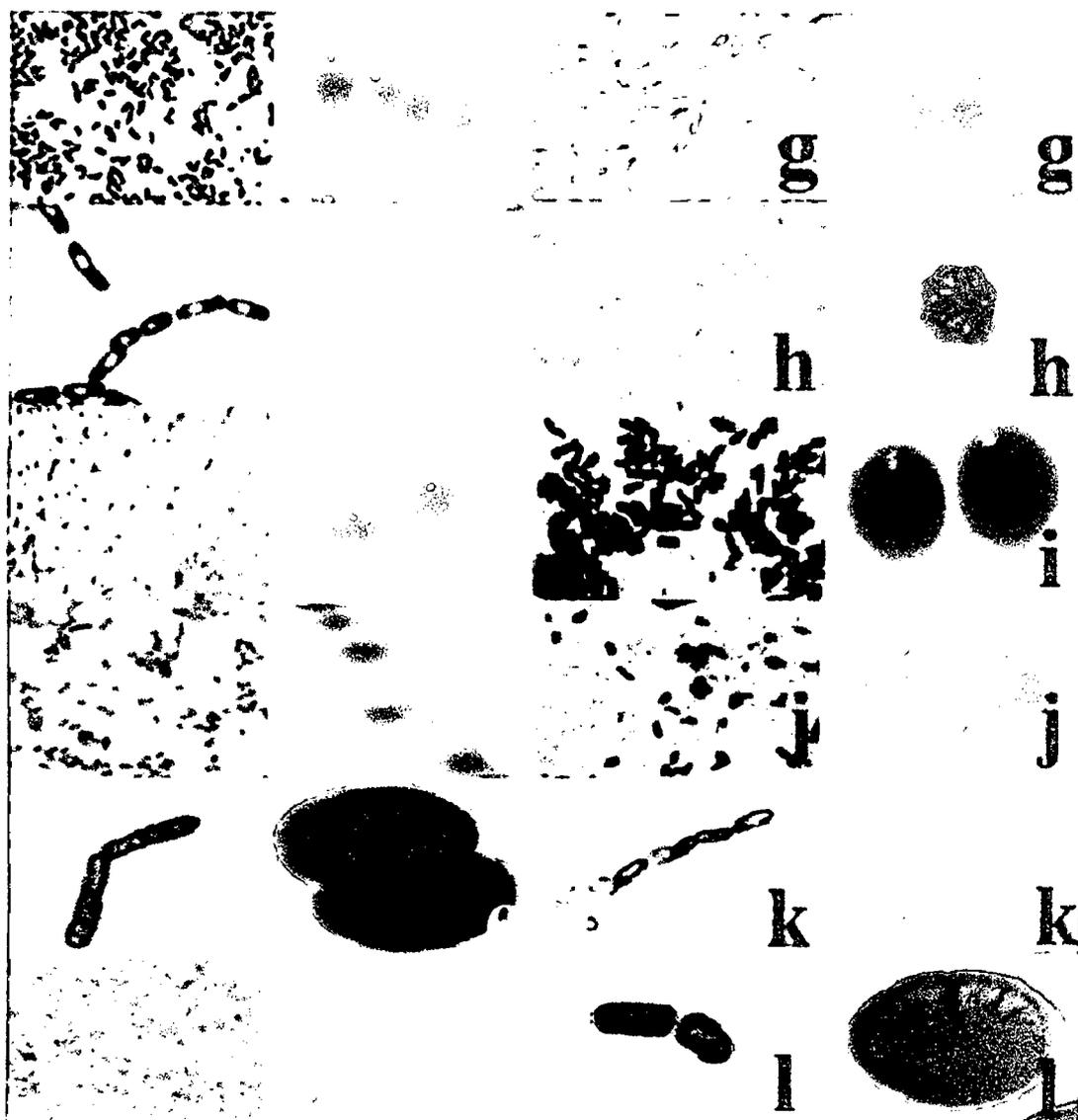


Figura 5. Morfología bacteriana (tinción de Gram) y detalle de colonias de cepas diazotróficas aisladas de rizósfera de arroz en medio MJV. A) La5b2m; B) La3c3m; C) La5b3m; D) p1c3m; E) p2e1m; F) p9b3m; G) p3a3m; H) p2a1m; I) p7b1m; J) p9e3m; K) p9d3m; L) p9a3m.

Todas las bacterias rizosféricas aisladas fueron capaces de crecer en los siguientes subcultivos en medio Burk y MJV, ambos libres de nitrógeno, si bien esto demuestra su capacidad de fijación de nitrógeno será necesario evidenciar la presencia del gen *nifH* (codifica la nitrato reductasa), método basado en el uso del isótopo ^{15}N y la reducción del acetileno en etileno (Hardarson y Atkins, 2003). La característica diferencial de crecimiento diazotrófico, se evidenció mediante la formación de una película cercana a la superficie del medio semisólido. A pesar de los avances en tecnologías de secuenciamiento de última generación, en muchos

casos el aislamiento inicial y la identificación de estos diazotróficos requieren medios semisólidos, en principio el medio semi-sólido permite el crecimiento bacteriano bajo condiciones donde la nitrogenasa sensible al oxígeno requiere protección (Baldani et al., 2014).

En el presente estudio se recuperaron y purificaron 23 aislamientos diazotróficos putativos en medio Burk, es posible que solo algunos aislamientos sean considerados verdaderos diazotróficos, tal como lo demostró Park et al. (2005), de 27 cepas elegidas en un proceso de selección primario, solo 5 cepas mostraron actividad nitrogenasa. Sarathambal et al. (2015), recuperó 60 aislamientos de bacterias diazotróficas putativas en medio malato libre de nitrógeno, de los cuales solo 11 fueron reconfirmados como verdaderos diazotróficos basándose en evidencia molecular (gen *nif*) y de la actividad nitrogenasa. Estas bacterias no-diazotróficas son probablemente bacterias oligotrofas, que utilizan el nitrógeno fijado y liberado por los verdaderos diazotróficos (Beneduzi et al., 2013).

Tabla 3. Características de aislamientos diazotróficos rizosféricos aislados de 2 suelos procedentes de la región San Martín.

Cepa	Código de trabajo	Procedencia	Variedad de arroz	Medio de cultivo	Características microscópicas			Características morfológicas					
					Gram	Forma	Agrupación	Catalasa	Mucosidad	Elevación	Borde	Consistencia	Color
la2b4	1LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	-	Bacilo	individuales	-	-	convexo	entero	cremosa	blanco
la2b3	2LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	-	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
la2b1	3LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	-	Bacilo	individuales	-	-	plano	entero	gelatinosa	blanco
la1a6	4LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	+	Bacilo	individuales	+	+	plano	irregular	cremosa	amarillo
la3c5	5LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	+	Bacilo	Individuales	+	-	plano	entero	cremosa	blanco
la2b2	7LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	-	Bacilo	individuales	-	-	convexo	entero	cremosa	blanco
la1a5	8LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	-	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	blanco
la3c3	9LB	Lamas-Cacatachi	La esperanza	Burk	-	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
la6c4	10LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	-	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
la1a4	12LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	-	Bacilo	individuales	+	-	convexo	Irregular	cremosa	blanco
la5c2	13LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	+	Bacilo	individuales	-	+	convexo	Irregular	gelatinosa	blanco
la5c4	14LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	+	Bacilo	individuales	-	-	convexo	Irregular	cremosa	blanco
la4c2	15LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	+	Bacilo	individuales	-	+	convexo	Irregular	cremosa	blanco
la3c6	16LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	+	Bacilo	individuales	-	-	convexo	Irregular	cremosa	amarillo
la6c1	17LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	-	Cocobacilo	individuales	+	+	convexo	entero	gelatinosa	blanco
la6c2	18LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	-	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
la5c5	19LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	-	Bacilo	individuales	-	-	convexo	entero	cremosa	blanco
la5c1	21LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	+	Bacilo	individuales	+	-	plano	Irregular	cremosa	blanco
la6c4	22LB	Lamas-Cacatachi	La conquista	Burk	-	Bacilo	individuales	-	-	convexo	entero	cremosa	blanco
La3c5m	1LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	+	Bacilo	individuales	+	+	plano	Irregular	cremosa	marrón
La5b2m	2LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	+	Bacilo	individuales	-	+	plano	entero	cremosa	blanco
La4a1m	4LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	+	Bacilo	individuales	+	+	plano	entero	cremosa	blanco

La5b5m	5LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	-	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	blanco
La3c4m	6LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	+	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	amarillo
La3c2m	8LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	-	Coco	Estreptococos	+	-	convexo	entero	cremosa	blanco
La1a1m	9LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
La4a3m	10LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
La5b4m	11LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	+	-	convexo	entero	gelatinosa	blanco
La3b3m	12LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	+	-	convexo	entero	cremosa	blanco
La3b7m	13LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	blanco
La3b1m	14LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	-	-	convexo	entero	cremosa	blanco
La3c3m	16LM	Lamas-Cacatachi	La esperanza	MJV	+	Bacilo	Estreptobacilos	+	+	convexo	entero	cremosa	amarillo
La5b1m	17LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	+	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
La1a4m	18LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	+	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	amarillo
La5b3m	19LM	Lamas-Cacatachi	Capirona	MJV	-	Bacilo	individuales	-	+	convexo	entero	cremosa	blanco
p1c3m	1P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Cocobacilo	individuales	+	+	convexo	entero	cremosa	blanco
p1a3m	3P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	-	-	convexo	entero	cremosa	blanco
p2e1m	5P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	Estreptobacilos	-	-	plano	entero	cremosa	marrón
p9b3m	6P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Cocobacilo	individuales	-	-	plano	entero	cremosa	blanco
p2b1m	7P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	-	-	plano	Irregular	cremosa	blanco
p3a3m	8P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	Diplobacilos	+	+	plano	Festoneado	cremosa	Crema
p2a1m	9P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	-	-	plano	irregular	cremosa	blanco
p7b1m	10P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	-	-	plano	irregular	cremosa	blanco
p9e3m	11P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	+	+	plano	irregular	gelatinosa	blanco
p5b2m	12P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	-	-	plano	entero	cremosa	blanco
p2c1m	14P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	-	-	plano	irregular	cremosa	blanco
p4c3m	15P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	amarillo
p9f3m	16P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	blanco
p5d2m	17P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	-	+	plano	entero	cremosa	blanco
p8d3m	18P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	+	-	plano	irregular	cremosa	amarillo

p1d3m	19P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Cocobacilo	individuales	-	-	plano	irregular	cremosa	marrón
p1a2	20P	Picota-Picota	La esperanza	Burk	+	Bacilo	individuales	+	-	plano	irregular	cremosa	blanco
p9d3m	21P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	-	-	plano	entero	cremosa	amarillo
p9a3m	22P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	Diplobacilos	+	-	plano	entero	cremosa	amarillo
p1b2	23P	Picota-Picota	La esperanza	Burk	+	Bacilo	individuales	-	-	plano	entero	cremosa	blanco
p5a2m	24P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Cocobacilo	individuales	+	-	plano	irregular	cremosa	blanco
p5c2m	26P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	crema
p1d2	28P	Picota-Picota	La esperanza	Burk	+	Bacilo	individuales	+	-	plano	entero	cremosa	marrón
p7c1m	29P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	-	Bacilo	individuales	+	+	convexo	entero	gelatinosa	blanco
p7d1m	30P	Picota-Picota	La esperanza	MJV	+	Bacilo	individuales	-	-	plano	irregular	cremosa	blanco

3.3. Producción de compuestos indólicos (AIA, ácido indol acético)

Sólo 03 cepas no fueron capaces de producir AIA en las condiciones establecidas (p2a1m, La3c3m, p2c1m) (Figura 6 y Tabla 4). En relación a la producción basal de AIA (sin suplemento de L-triptófano), el 35% de las cepas no produjeron AIA a una concentración medible a través de la metodología establecida. El 75% restante produjo AIA en un rango muy variable (1,04 – 147,71 μg AIA/ ml de TSB).

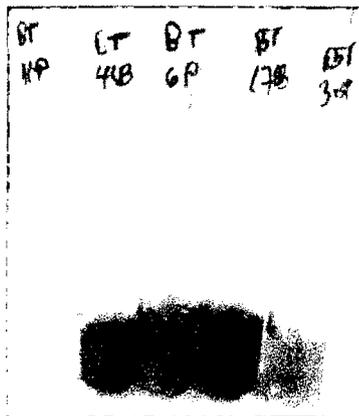


Figura 6. Evaluación de la producción de AIA en medio de cultivo sin suplementar y suplementado con 600 mg de L-triptófano L^{-1}

Cuando se estudió el potencial de las cepas para producir AIA (600 mg de L-triptófano L^{-1}), solo el 10% de las cepas no produjeron cantidad detectable de AIA. El 90% de las cepas produjo AIA en un rango muy variable (0,76 – 102,84 μg AIA/ ml de TSB). Cabe mencionar que el 78,3% de las cepas evaluadas mostraron un aumento en la producción de AIA superior cuando el medio se suplementó con 600 mg de L-Triptófano. El 21,7% de las cepas mostraron un comportamiento diferente, reducción de la producción de AIA cuando el medio fue suplementado con L-triptófano. La producción basal de AIA en medio TSB sin triptófano de las cepas La5c5 y La1a4 procedente de Cacatachi fue estadísticamente diferentes al resto de cepas, Sin embargo no hubo diferencias significativas en la producción potencial de AIA en medio suplementado con triptófano de las cepas.

En relación a la producción de AIA expresado en mg de proteína celular, el rango estuvo entre 0,02 a 73,1 μg AIA/ mg de proteína. Por el contrario el medio suplementado la producción de AIA expresada en proteína celular fue menor. La producción basal de AIA en medio TSB sin triptófano/ mg de proteína fue estadísticamente significativa en las cepas la5c1, la5c5, p7bm1, p1a2 y p9e3m,

diferenciándose del resto de cepas. La producción de AIA en medio TSB con triptófano/mg de proteína fue estadísticamente significativo en las cepas p7b1m y p1a2, ambas aisladas de Picota.

Tabla 4. Evaluación de la producción de ácido 3-indol acético (AIA) en condiciones en medio TSB suplementado con 600 mg L-triptófano L⁻¹(TSB + T) y sin suplementar (TSB – T).

CEPA	CÓDIGO DE TRABAJO	µg AIA/ ml de TSB		µg AIA/ mg de proteína	
		TSB -T	TSB +T	TSB -T	TSB +T
p1b2	23P	9,95 KLMNOP	0,00 O	1,32 DE	0,00 K
la2b3	2LB	9,79 KLMNOP	13,02 JKLMNO	1,40 DE	1,15 HIJK
la5c2	13LB	8,39 LMNOP	15,71 IJKLMNO	6,13 DE	1,13 HIJK
p5c2m	26P	7,22 MNOP	7,58 KLMNO	1,80 DE	0,86 JK
la3c3	9LB	63,63 C	10,71 JKLMNO	9,88 D	1,08 HIJK
p7b1m	10P	58,75 CD	42,50 EFGHI	33,43 B	19,37 A
la4b3m	3LM	56,20 CDE	93,06 A	8,32 DE	2,27 GHIJK
la6c1	17LB	52,09 CDEF	25,06 GHIJKLMNO	2,92 DE	1,27 GHIJK
la5c1	21LB	50,47 CDEFG	0,00 O	73,10 A	1,30 GHIJK
la2b2	7LB	5,76 NOP	16,23 IJKLMNO	1,01 DE	1,08 HIJK
La5b5m	5LM	5,71 NOP	8,07 KLMNO	1,10 DE	0,13 K
La5b2m	2LM	5,58 NOP	7,62 KLMNO	0,73 E	0,16 K
la1a6	4LB	43,08 CDEFGH	83,65 AB	5,53 DE	1,41 GHIJK
<i>E. americanus</i>	c(+)	4,53 NOP	9,63 JKLMNO	0,42 E	0,16 K
p3a3m	8P	4,22 NOP	11,15 JKLMNO	0,72 E	2,27 GHIJK
p9e3m	11P	39,82 DEFGHI	36,26 EFGHIJ	21,20 C	7,11 CD
p9b3m	6P	34,92 EFGHIJ	46,15 DEFGH	2,05 DE	10,78 B
p9d3m	21P	34,64 FGHIJ	43,82 EFGH	2,10 DE	4,49 DEFGH
p5a2m	24P	33,23 FGHIJ	72,55 ABCD	5,16 DE	6,29 CDEF
la6c4	10LB	32,94 GHIJ	19,02 GHIJKLMNO	6,89 DE	1,45 GHIJK
la1a5	8LB	30,34 GHIJK	33,81 EFGHIJK	2,87 DE	1,35 GHIJK
p1a2	20P	28,75 HIJKL	46,87 DEFG	22,17 C	17,50 A
la2b4	1LB	28,05 HIJKLM	30,06 FGHIJKLM	5,15 DE	1,21 GHIJK
p5b2m	12P	24,07 HIJKLMN	18,20 IJKLMNO	1,76 DE	1,28 GHIJK
p5d2m	17P	23,70 HIJKLMN	0,00 O	7,49 DE	0,00 K
p1d3m	19P	22,27 HIJKLMNO	5,57 LMNO	2,59 DE	2,72 FGHJK
la3c5	5LB	20,24 IJKLMNOP	18,08 IJKLMNO	8,48 DE	1,16 HIJK
La4a1m	4LM	2,27 OP	6,39 LMNO	0,42 E	0,11 K
la5c4	14LB	18,44 IJKLMNOP	10,47 JKLMNO	5,53 DE	1,25 GHIJK
la3c6	16LB	17,74 JKLMNOP	0,00 O	7,99 DE	1,34 GHIJK
p1c3m	1P	16,33 JKLMNOP	21,45 GHIJKLMNO	2,68 DE	7,34 BCD
la5c5	19LB	147,71 A	58,49 BCDE	41,87 B	1,18 GHIJK

p7d1m	30P	13,99 JKLMNOP	74,21 ABC	5,86 DE	6,40 CDE
p9f3m	16P	12,89 KLMNOP	32,00 EFGHIJKL	2,63 DE	8,54 BC
p7c1m	29P	11,41 KLMNOP	29,10 FGHJKLMN	3,53 DE	4,77 DEFG
p2b1m	7P	11,41 KLMNOP	47,16 CDEFG	3,94 DE	3,31 EFGHIJK
la1a4	12LB	102,40 B	24,33 GHIJKLMNO	7,48 DE	1,32 GHIJK
La5b4m	11LM	1,33 OP	6,67 KLMNO	0,17 E	0,16 K
p4c3m	15P	1,31 OP	11,88 JKLMNO	0,57 E	2,48 GHIJK
La3c4m	6LM	1,26 OP	52,81 CDEF	0,18 E	1,73 GHIJK
la4c2	15LB	0,51 P	0,00 O	0,08 E	0,89 IJK
La1a4m	18LM	0,51 P	8,14 KLMNO	0,05 E	0,24 K
p9a3m	22P	0,38 P	28,46 FGHJKLMN	0,14 E	4,51 DEFGH
La1a1m	9LM	0,20 P	19,27 HIJKLMNO	0,02 E	0,43 K
La3b3m	12LM	0,15 P	16,02 IJKLMNO	0,02 E	0,26 K
La3c5m	1LM	0,15 P	12,72 JKLMNO	0,02 E	0,25 K
la2b1	3LB	0,09 P	0,00 O	0,02 E	1,22 GHIJK
p1d2	28P	0,00 P	15,75 IJKLMNO	0,00 E	4,47 DEFGHI
p2e1m	5P	0,00 P	7,94 KLMNO	0,00 E	4,18 DEFGHIJ
la6c2	18LB	0,00 P	16,02 IJKLMNO	0,00 E	1,03 HIJK
La3b7m	13LM	0,00 P	29,79 FGHJKLM	0,00 E	0,85 JK
La4a3m	10LM	0,00 P	15,38 IJKLMNO	0,00 E	0,62 JK
p1a3m	3P	0,00 P	2,14 NO	0,00 E	0,48 K
La4a2m	7LM	0,00 P	6,54 LMNO	0,00 E	0,24 K
la3c8m	15LM	0,00 P	6,79 KLMNO	0,00 E	0,22 K
la3c2m	8LM	0,00 P	4,25 MNO	0,00 E	0,1 K
La5b1m	17LM	0,00 P	4,28 MNO	0,00 E	0,1 K
La5b3m	19LM	0,00 P	2,48 NO	0,00 E	0,06 K
p8d3m	18P	0,00 P	0,10 O	0,19 E	0,02 K
La3b1m	14LM	0,00 P	0,25 O	0,00 E	0,01 K
p2a1m	9P	0,00 P	0,00 O	0,00 E	0,00 K
La3c3m	16LM	0,00 P	0,00 O	0,00 E	0,00 K
p2c1m	14P	0,00 P	0,00 O	0,00 E	0,00 K

La producción de fitohormonas es el mecanismo más usado para explicar los beneficios de las PGPR sobre las plantas (García de Salamone et al., 2005), jugando un papel fundamental en su crecimiento y desarrollo. Cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de producir AIA. La producción de AIA por la cepa la5c1 (73,10 μg AIA/mg proteína) fue similar a lo reportado por Venieraki et al. (2011) en cepas diazotróficas productoras de AIA en el rango de 18,4 a 194,8 μg AIA/mg proteína. Sarathambal et al. (2015), reportó que *Serratia* sp. CB2, alcanzó una producción máxima de 36,8 μg AIA/mg proteína, muy superior a lo reportado en la presente investigación. Con el fin de usar estas cepas con gran potencial de

producción de AIA como biofertilizantes para arroz, es necesario realizar bioensayos para inducir germinación temprana, proliferación de raíces laterales y pelos radicales, y así evitar un efecto negativo y/o fitotoxicidad como inhibición de la germinación por excesiva concentración de AIA (Bose et al., 2016).

3.4. Solubilización de fosfato tricálcico insoluble

El 61,7% (35 cepas) de las cepas aisladas pudo solubilizar el fosfato tricálcico en el medio LB (0,1%), el cual se evidenció por la formación de un halo claro alrededor de las colonias (Figura 7). La Tabla 5 muestra la eficiencia de la solubilización de fosfato tricálcico insoluble. El 33,3% (20 cepas) crecieron en dicho medio pero no tuvieron actividad de solubilización, y solo 5% (3 cepas) no fueron capaces de crecer en dicho medio. Se observó una actividad de solubilización temprana (a los 4 días después de la inoculación) en el 55% de las cepas en estudio, alcanzando una mayor actividad de solubilización la cepa p7b1m con 327,33 de eficiencia a los 4 días y una eficiencia máxima de 336,33 a los 12 días. La cepa control de *Ensifer americanus* 5750R fue capaz de solubilizar fosfato tricálcico en medio LB, alcanzando una eficiencia en la solubilización de 225,71, siendo superadas por muchas cepas nativas (Figura 7).

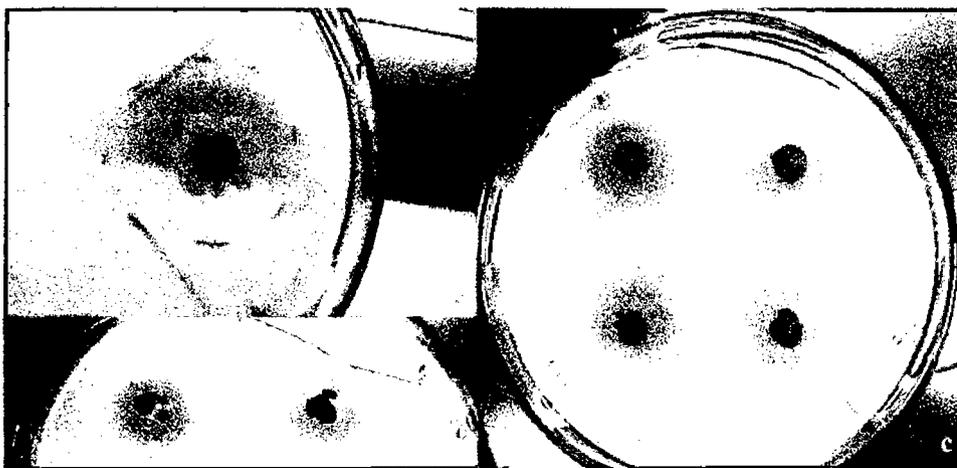


Figura 7. Ensayo de solubilización de fosfato en medio LB suplementado con 0,1% de fosfato tricálcico. A) *Ensifer americanum* 5750R B) p7b1m; C) la2b2.

Al finalizar la evaluación (12 días después de la siembra), las cepas p7b1m, p9b3m, la2b2, la3c5m y p2b1m, alcanzaron una eficiencia de solubilización superior al 300% estadísticamente significativa y superior al resto de cepas.

Tabla 5. Eficiencia de la solubilización de fosfato tricálcico insoluble a los 4, 8 y 12 días después de la inoculación de cepas diazotróficas rizosféricas en medio LB suplementado con 0,1% de fosfato tricálcico insoluble.

Cepa	Código de trabajo	4d	8d	12d
p7b1m	10	327,33 A	336,66 A	336,66 A
p9b3m	6	210,47 E	260,47 BCDE	316,46 A
la2b2	7	286,84 BC	292,35 B	304,3 A
La3c5m	1	292,35 B	285,14	303,54 A
p2b1m	7	184,87 EFGH	242,54 DEFG	303,41 A
la2b3	2	307,67 AB	258,63 BC	258,63 B
La3b7m	13	157,33 FGHIJ	214,14 GHIJ	243,52 BC
La1a1m	9	214,61 DE	243,92 DEFG	243,44 BC
la4b3m	3	191,24 EFGH	204,99 HIJKL	242,77 BC
La3c4m	6	0,00	201,86 HIJKL	237,50 BCD
<i>E. americanus</i>	Control (+)	199,63 EF	226,49 EFGH	228,65 BCDE
La3b1m	14	182,73 EFGHI	199,91 HIJKL	225,94 BCDEF
La5b4m	11	160,49 FGHIJ	224,75 FGH	224,87 BCDEF
p5c2m	26	285,92 BC	267,29 BCD	223,8 BCDEF
La3c2m	8	183,18 EFGHI	222,079 FGHI	223,17 BCDEF
La4a3m	10	108,57 K	154,23 MNOP	221,40 BCDEF
p1c3m	1	219,772 DE	209,97 GHIJK	209,97 CDEFG
p9d3m	21	186,65 EFGH	186,64 IJKLM	258,63 B
la1a6	4	214,82 DE	198,59 HIJKL	208,46 CDEFG
la5c1	21	207,18 E	210,39 GHIJK	202,16 CDEFG
la3c8m	15	154,97 GHIJ	174,52 KLMNO	198,34 CDEFGH
la1a4	12	152,27 GHIJ	152,57 MNOP	195,69 CDEFGH
la5c4	14	0,00	182,16 JKLMN	195,66 CDEFGH
p1d3m	19	182,83 EFGHI	182,83 JKLMN	182,83 EFGHI
la6c4	10	194,87 EFG	220,62 HIJKL	198,85 DEFGH
La3c3m	16	140,79 IJK	158,11 MNOP	177,37 FGHIJ
p2a1m	9	177,35 EFGHIJ	177,35 JKLMNO	177,35 FGHIJ
la3c6	16	156,22 GHIJ	176,06 KLMNO	170,77 GHIJK
La5b3m	19	135,63 JK	146,68 NOP	157,90 HIJKL
la 3c5	5	155,34 GHIJ	148,67 NOP	147,34 IJKL
p5a2m	24	187,18 EFGH	187,18 IJKLM	190,68 DEFGHI
p9a3m	22	269,97 BC	252,53 CDEF	188,48 EFGHI
p1d2	28	182,73 EFGHI	182,73 JKLMN	185,07 EFGHI
p1d3m		0,00	0,00	182,83 EFGHIJ

La3c3m	16	140,79 IJK	158,11 MNOP	177,37 FGHIJ
p2a1m		0,00	0,00	177,35 EFGHIJ
la3c6		0,00	0,00	170,77 GHIJK
La5b2m	2	150,20 HIJ	170,53 LMNO	134,42 JKLM
la2b1	3	148,41 HIJ	143,02 OP	133,91 JKL
la2b4	1	148,41 HIJ	143,02 OP	133,91 JKL
p7c1m	29	107,25 K	109,63 Q	127,58 KL
la5c2	13	152,87 GHIJ	132,58 PQ	118,85 L
p1a3m	3		NC	
p9e3m	11		NC	
p2c1m	14		NC	
La4a1m	4		CNS	
La5b5m	5		CNS	
La3b3m	12		CNS	
La5b1m	17		CNS	
La1a4m	18		CNS	
la1a5	8		CNS	
la3c3	9		CNS	
la4c2	15		CNS	
la6c1	17		CNS	
la6c2	18		CNS	
p2e1m	5		CNS	
p3a3m	8		CNS	
p5b2m	12		CNS	
p4c3m	15		CNS	
p9f3m	16		CNS	
p5d2m	17		CNS	
p8d3m	18		CNS	
p1a2	20		CNS	
p1b2	23		CNS	
p7d1m	30		CNS	

NC: No creció; CNS: Creció pero no solubilizó

El fósforo es un elemento limitante en el cultivo de arroz (da Costa et al., 2015), teóricamente algunos fijadores de nitrógeno, tienen la capacidad de solubilizar los fosfatos insolubles en los suelos, haciendo más eficiente la nutrición de las plantas. La eficiencia en la solubilización de fosfato tricálcico alcanzó niveles de hasta 336,66 % con aislamientos nativos de suelos rizosféricos. Sarathambal et al. (2015), reportó niveles de solubilización de fosfato tricálcico insoluble de 250 % para *Serratia* sp. CB2, siendo inferiores a nuestras cepas. Por el contrario, Castellano-Hinojosa et al. (2015), reportó el aislamiento de *Burkholderia multivorans* C16 expresando altos

valores de eficiencia en la solubilización de fosfato de 1363%. Debido a que los suelos en estudio poseen pHs cercanos a la neutralidad, la selección de bacterias usando fosfato tricálcico insoluble es adecuada, y probablemente debido a la producción de ácidos orgánicos (Bashan et al., 2012). Hubieron cepas de microorganismos que crecieron en la placa con medio suplementado con fosfato tricálcico, pero no mostraron actividad de solubilización de fosfato a través del halo característico. Esto ocurre cuando el tipo de solubilización se denomina acomplejamiento de metales (Arcand y Schneider, 2006), es decir la liberación de agentes quelantes sin la formación del típico halo de solubilización. Es por esa razón que debe evaluarse constantemente el potencial de solubilización de fosfatos en las cepas, bajo condiciones "in vitro", a nivel de invernadero y en campo.

3.5. Ensayos de actividad anti fúngica

Los ensayos de actividad antifúngica se llevaron a cabo mediante dos evaluaciones: Antagonismo, enfrentándose en cultivo dual cepa bacteriana y hongo fitopatógeno, y la antibiosis, enfrentando en el mismo espacio cepa bacteriana y hongo fitopatógeno. El 38,3 % de las cepas tuvo capacidad antagonista contra *Rhizoctonia solanii*, siendo la más efectiva la cepa la3c3 con un 88,59% de inhibición (Figura 8, Tabla 6) y solo el 31,7% contra *Rhizoctonia oryzae sativae*, siendo la más efectiva la cepa la2b3, con un 72,37% de inhibición (Figura 9, Tabla 6).



Figura 8. Evaluación del antagonismo de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz, contra cepa de *Rhizoctonia solanii*.



Figura 9. Evaluación del antagonismo de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz, contra cepa de *Rhizoctonia oryzae sativae*.

En relación a la antibiosis, el 81,7% de las cepas bacterianas redujo el diámetro de la colonia fúngica de *Rhizoctonia solanii*, siendo la cepa la6c4 la que alcanzó una mayor antibiosis contra este hongo (92,72 %) (Figura 10, Tabla 6).



Figura 10. Evaluación de la antibiosis de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz contra la cepa de *Rhizoctonia solanii*.

Así mismo el 70% de las cepas bacterianas redujo el diámetro de la colonia fúngica de *Rhizoctonia oryzae sativae*, siendo la cepa la2b2 la que alcanzó una mayor antibiosis contra este hongo (Figura 11, Tabla 6).

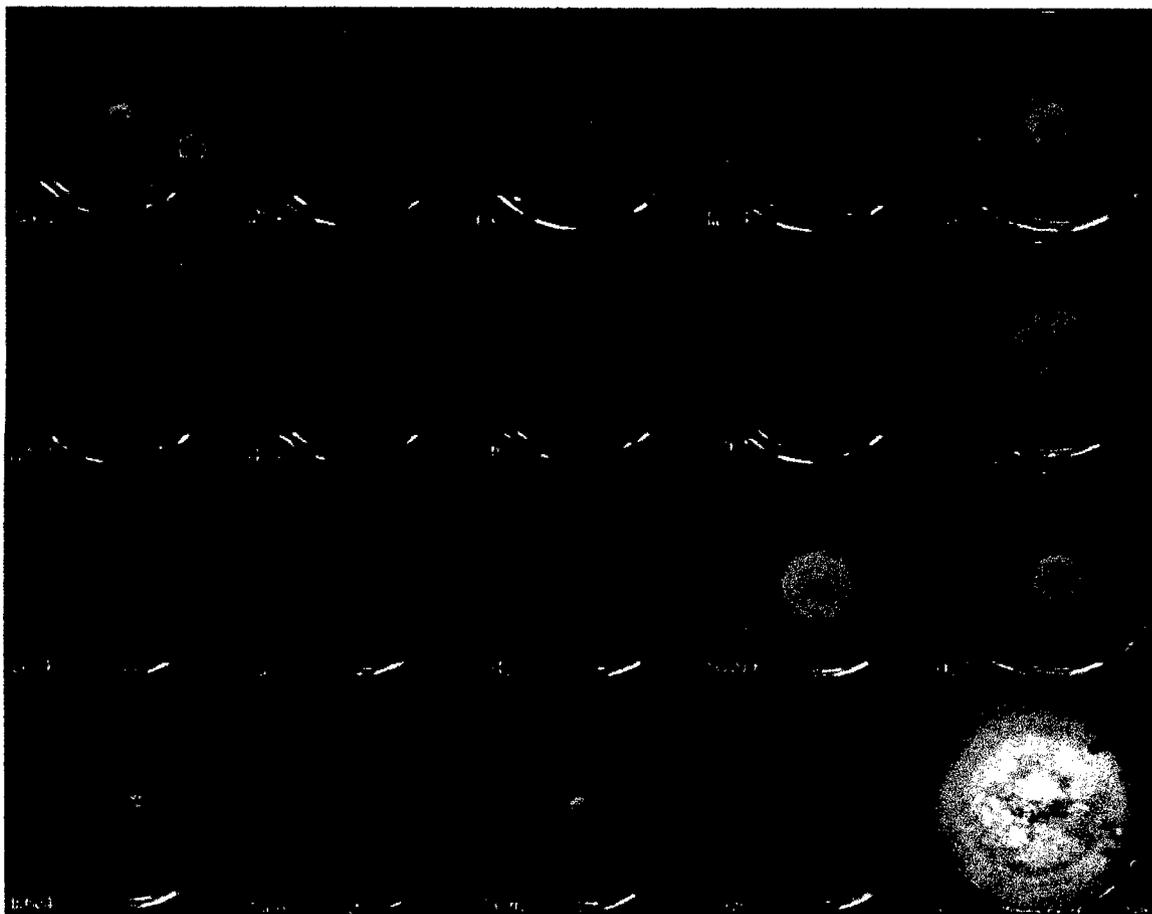


Figura 11: Evaluación de la antibiosis de bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de arroz, contra la cepa de *Rhizoctonia oryzae sativae*.

En general un mayor porcentaje de cepas bacterianas con capacidad antifúngica son provenientes de la zona de Cacatachi aisladas en medio Burk (63,2%), frente a los aislamientos de la zona de Cacatachi en medio MJV (37,5%) y de aquellos de la zona de Picota (8 y 20%, para los medios de Burk y MJV, respectivamente).

Se evidenció diferencias significativas entre las cepas cuando se evaluaron las propiedades anti fúngicas (antagonismo y antibiosis) de las bacterias rizosfericas, contra *Rhizoctonia solanii*, mas no contra *Rhizoctonia oryzae sativae*.

La Tabla 6 muestra la evaluación realizada del efecto antifúngico de las cepas bacterianas aisladas contra las cepas de hongos fitopatógenos de *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae sativae*, utilizados en las pruebas de antagonismo y antibiosis.

Tabla 6. Evaluación del efecto fungicida a través de antagonismo y antibiosis, de cepas fitopatógenas de *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae sativae* por bacterias diazotróficas rizosféricas. Las letras en mayúscula representan las diferencias significativas entre cepas y las letras minúsculas significan diferencias significativas de una misma cepa en los diversos tratamientos experimentales.

Cepa	código de trabajo	<i>Rhizoctonia solanii</i>		<i>Rhizoctonia oryzae sativae</i>	
		% inhibición antagonismo	% inhibición antibiosis	% inhibición antagonismo	% inhibición antibiosis
la2b2	7LB	70,22 CDEF b	91,50 A a	69,85 ABC b	91,67 A a
p9a3m	22P	60,67 IJ b	88,96 A a	58,52 GH b	90,84 AB a
la5c4	14LB	65,78 EFGHI b	91,11 A a	64,37 DEF b	90,31 AB a
la3c3	9LB	88,59 A a	91,01 A a	66,22 BCDEF b	89,89 AB a
La5b1m	17LM	65,96 EFGHI b	91,17 A a	61,63 FG b	89,23 AB a
la3c6	16LB	74,30 C b	91,51 A a	69,33 ABCD b	89,13 AB a
la2b1	3LB	72,07 CD b	90,70 A a	69,33 ABCD b	88,63 AB a
la2b4	1LB	68,15 DEFGH b	87,54 A a	65,41 CDEF b	88,37 ABC a
la5c5	19LB	66,52 DEFGH b	90,43 A a	63,56 EFG b	87,88 ABC a
la1a4	12LB	79,78 B b	89,52 A a	70,81 ABC c	87,68 ABC a
la2b3	2LB	68,44 DEFG b	90,31 A a	72,37 A b	87,63 ABC a
la6c4	10LB	63,15 HI b	90,7 A a	62,48 FG b	82,81 BCD a
La3c4m	6LM	64,00 GHI c	89,08 A a	67,26 ABCDE c	82,62 CDE b
La5b2m	2LM	70,44 CDE b	88,41 A a	68,96 ABCDE b	81,45 DE ab
p7b1m	10P	64,52 FGHI c	90,09 A a	67,33 ABCDE c	80,34 E b
La3c2m	8LM	68,74 CDEFG c	88,85 A a	71,04 AB c	80,07 E b
la6c1	17LB	0,00 M c	81,28 B a	0,00 J c	62,18 F b
p1a2	20P	0,00 M c	76,03 BCD a	0,00 J c	61,40 F b
p5d2m	17P	0,00 M c	71,30 CDEFGH a	0,00 J c	61,30 F b
La4a1m	4LM	0,00 M c	75,84 BCD a	0,00 J c	59,61 F b
p1c3m	1P	0,00 M c	73,56 CDE a	0,00 J c	59,46 F b
p7d1m	30P	0,00 M c	68,68 EFGH a	0,00 J c	57,8 FG b
La3b3m	12LM	0,00 M c	71,97 CDEF a	0,00 J c	53,11 GH b
la5c1	21LB	0,00 M c	75,66 BCD a	0,00 J c	50,08 HI b
la3c5	5LB	0,00 M c	77,11 BC a	0,00 J c	49,70 HIJ b
la4c2	15LB	57,56 JK b	75,43 BCD a	29,46 I d	46,50 IJK c
la1a5	8LB	0,00 M c	65,98 FGHI a	0,00 J c	46,00 IJK b
La3c5m	1LM	0,00 M c	76,22 BCD a	0,00 J c	45,42 IJKL b
la1a6	4LB	0,00 M b	44,85 K a	0,00 J b	44,19 JKLM a
La1a4m	18LM	58,30 J b	71,61 CDEFG a	0,00 J d	42,76 KLM c
p2c1m	14P	0,00 M c	74,36 CDE a	0,00 J c	42,62 KLM b
La5b5m	5LM	0,00 M c	65,40 GHI a	0,00 J c	39,80 LM b
p2b1m	7P	50,37 L b	65,00 HI a	0,00 J c	38,89 M b
La5b3m	19LM	0,00 M c	65,98 FGHI a	0,00 J c	38,62 M b
La3b7m	13LM	0,00 M c	60,2 I a	0,00 J c	33,33 N b

La5b4m	11LM	0,00 M c	61,97 I a	0,00 J c	32,69 N b
p7c1m	29P	0,00 M b	33,03 L a	0,00 J b	31,67 N a
La1a1m	9LM	52,74 KL a	52,45 J a	55,78 H a	31,45 N b
la5c2	13LB	0,00 M c	53,44 J a	0,00 J c	29,46 N b
p8d3m	18P	0,00 M c	18,81 P a	0,00 J c	9,94 O b
p9b3m	6P	0,00 M c	33,93 L a	0,00 J c	6,30 OP b
p5c2m	26P	0,00 M b	70,36 DEFGH a	0,00 J b	0,00 P b
p3a3m	8P	0,00 M b	31,04 LM a	0,00 J b	0,00 P b
p2e1m	5P	0,00 M b	29,05 LMN a	0,00 J b	0,00 P b
p2a1m	9P	0,00 M b	25,25 MNO a	0,00 J b	0,00 P b
p9e3m	11P	0,00 M b	24,81 NO a	0,00 J b	0,00 P b
p1b2	23P	0,00 M b	20,74 OP a	0,00 J b	0,00 P b
p4c3m	15P	60,30 IJ a	1,26 Q b	0,00 J b	0,00 P b
p1d3m	19P	57,56 JK a	0,00 Q b	0,00 J b	0,00 P b
La3b1m	14LM	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
La4a3m	10LM	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
p5b2m	12P	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
La3c3m	16LM	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
p9f3m	16P	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
la6c2	18LB	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
p9d3m	21P	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
p5a2m	24P	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
p1d2	28P	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a
p1a3m	3P	0,00 M a	0,00 Q a	0,00 J a	0,00 P a

La evaluación de las 3 características de promoción del crecimiento de bacterias rizosféricas diazotróficas de arroz (producción de ácido 3-indol acético AIA, solubilización de fosfatos insolubles y evaluación del potencial antifúngico frente a dos agentes de la pudrición de tallos y vainas de arroz: *Rhizoctonia solanii* y *Rhizoctonia oryzae-sativae*), no fue exclusivo de una sola cepa.

Gran parte de los aislamientos evaluados, exhibieron actividad inhibitoria de crecimiento contra dos especies de *Rhizoctonia*, estos podrían ser usados como potenciales biopesticidas. Sarathambal et al. (2015), reportó actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solanii* de 11 cepas de bacterias rizosféricas pertenecientes a los géneros: *Enterobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* y *Serratia*. Ji et al. (2014). Evaluó la actividad antagonista de *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Klebsiella* y *Microbacterium* contra *R. solanii*. Nandakumar et al. (2001), reportó que bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, controlan el quemado de las vainas. Chung et al. (2015), reportó una nueva especie de *Bacillus oryzicola* que tiene actividad antifúngica contra *R. solanii*

KCTC 40101. En los casos de antagonismo, el mecanismo de acción podría ser debido a la producción de metabolitos volátiles o difusibles en el medio de evaluación.

Las bacterias rizosféricas diazotróficas en estudio mostraron alguna de las características PGPR analizadas. Con el objetivo de reducir el número de variables, perdiendo la menor cantidad de información posible, se realizó un análisis de componentes principales (Baró y Alemani, 2000; Castellano-Hinojosa et al., 2015). Este análisis incluyó la producción basal de AIA (Sin adición de triptófano), la producción potencial de AIA (Con adición de triptófano), la eficiencia en la solubilización de fosfato a los 12 días después de la inoculación, el antagonismo contra *R. solanii* y *R. oryzae-sativae*, así como la antibiosis contra *R. solanii* y *R. oryzae-sativae*; Los cuatro primeros componentes representan el 97,34% de la varianza.

En el análisis de PCA (Figura 12), el factor 1 representa el 70,13% de la variabilidad en las propiedades de las cepas, y se encuentra representado por la eficiencia en la solubilización de fosfatos ya que posee una mayor correlación positiva con la eficiencia en la solubilización de fosfatos insolubles. El factor 2 representa el 18,63% de las varianzas analizadas y se encuentra representada por el ensayo de antibiosis en *R. oryzae-sativae*. El factor 3 representa el 4,84% de las varianzas analizadas y se encuentra representada por la evaluación de la producción basal de AIA por las cepas diazotróficas. Por último, el factor 4 representa el 3,84% de las varianzas analizadas y se encuentra representada por la evaluación del antagonismo con *Rhizoctonia solanii*, además se observa una correlación negativa con la evaluación de la antibiosis contra *R. solanii*. (Tabla 7 y Figura 12).

Tabla 7: Cargas factoriales (F1, F2, F3 y F4) de la evaluación de la producción basal de AIA (AIA -Tryp), producción potencial de AIA (AIA +Tryp), solubilización de fosfato a los 12 días (Sol P), evaluación del antagonismo contra *R. solanii* (Antg RS), evaluación del antagonismo contra *R. oryzae-sativae* (Antg RO), evaluación de la antibiosis contra *R. solanii* (Antb RS) y evaluación de la antibiosis contra *R. oryzae-sativae* (Antb RO), como resultado del análisis de componentes principales (PCA).

Parámetros de evaluación	F1	F2	F3	F4
AIA -Tryp	2,851	7,685	23,385	-0,037
AIA +Tryp	2,411	-1,407	17,374	-2,963
Sol P	110,091	-10,290	-0,509	-0,722
Antg RS	9,863	23,223	0,290	18,414
Antg RO	11,218	23,956	-1,117	9,589
Antb RS	9,611	31,301	-3,716	-14,045
Antb RO	9,644	32,743	-0,738	-6,995

Las cepas p7b1m, la2b2, la3c5m, p2b1m, p9b3m, la2b3, la3c3, la5c5, tuvieron la máxima contribución a la varianza total. De este análisis se deduce que la evaluación a nivel de invernadero permitirá seleccionar aquellas cepas que de manera individual o en conjunto puedan ser utilizadas como biofertilizantes y bioprotectores para mejorar el rendimiento del cultivo de arroz, con dosis menores de biofertilizantes.

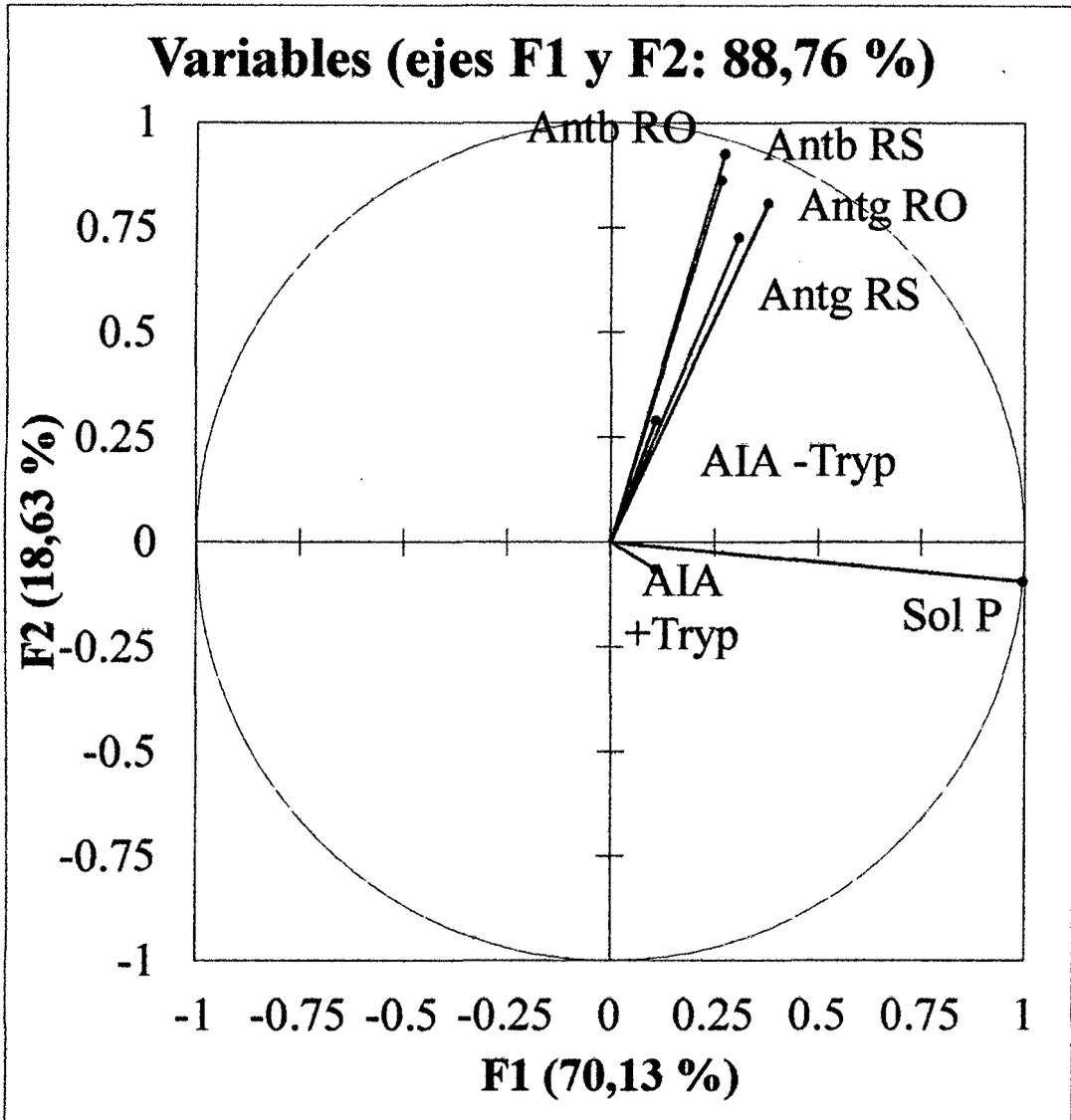


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros evaluados en las cepas de bacterias rizosféricas diazotróficas.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que:

- 1. Existe una gran diversidad de microorganismos rizosféricos capaces de expresar actividades de promoción del crecimiento, más de una cepa pudo expresar más de una característica de promoción "in vitro".**
- 2. Nuevos microorganismos fueron seleccionados, los cuales serán evaluados en una próxima etapa de selección a nivel de invernadero.**
- 3. Estas cepas potenciales pueden contribuir significativamente a incrementar la productividad del cultivo de arroz en la región San Martín.**

V. RECOMENDACIONES

- 1. Realizar los estudios de identificación taxonómica (bioquímica y molecular) a nivel de género.**
- 2. Continuar con los ensayos a nivel de invernadero para la selección de cepas PGPR efectivas, y su efectividad a nivel de rendimiento y protección de enfermedades.**

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adame-García, J., Luna-Rodríguez, M. y Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Vanilla Rhizobacteria as antagonists against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 18: 23-30.
- Adesemoye, A., Torbert, H. y Kloepper, J. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*. 58: 921-929.
- Agrios, G.N. (2005). Plant pathology 5th ed. Elsevier Publications.
- Araujo, A. E. da S., Baldani, V. L. D., Galisa P. de S., Pereira J. A. y Baldani J. I. (2013). Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the northeast region of Brazil. *Applied Soil Ecology*. 64: 49-55.
- Arcand M. M., Schneider K. D. (2006). Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78: 791–807.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I. y Dobereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*. 30: 485–491.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Bodey, L. H. y Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: A practical guide for microbiologists. *Plant and soil*. 384: 413-431.
- Baró, J. y Alemany, R. (2000). "Estadística II". Ed. Fundació per a la Universitat Oberta de Catalunya. Barcelona.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., de Bashan L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*. 49 (4): 465-479.
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L.K., Lisboa, B. B., Favreto, R., Baldani, J. I. y Pasaglia, L. M. P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the south of Brazil. *Applied Soil Ecology*. 63: 94-104.

- BCRP, Banco Central de Reserva Del Perú. (2015). Caracterización de la región San Martín.
- Bishnoi, U. (2015). PGPR Interactions: An ecofriendly approach promoting the sustainable agriculture system. Chapter four. *Advances in Botanical Research*. 75: 81-113.
- Bose, A., Kher, M., Nataraj, M. y Keharia, H. (2016). Phytoestimulatory effect of indol-3 acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng rhizosphere. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Accepted Manuscript.
- Buresh, R. J., Reddy, K. R. y van Kessel, C. (2008). Nitrogen transformations in submerged soils. In: Schepers, J.S. y Raun, W.R. (Eds.), Nitrogen in Agricultural Systems. *Agronomy Monograph 49*. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, Wis., USA, pp. 401–436.
- Castellano-Hinojosa, A., Correa-Galeote, D., Palau, J. y Bedmar, E. J. (2016). Isolation of N₂ fixing rhizobacteria from *Lolium perenne* and evaluating their plant growth promoting traits. *Journal of Basic Microbiology*. 56: 85-91.
- Chandler, D., Davidson, G., Grant, W. P., Greaves, J. y Tatchell, G. M. (2008). Microbial bio pesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends in Food Science and Technology*. 19: 275-283.
- Chung, E. J., Hossain, M. T., Khan, A., Kim, K. H., Jeon C. O. y Chung, Y. R. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systematic resistance inducing activities in rice. *The Plant Pathology Journal*. 31: 152-164.
- Da Costa, E. M., de Lima, W., Olivera-Longatti, S. M. y de Souza, F. M. (2015). Phosphate-solubilizing bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate. *Ecological Engineering*. 83: 380-385.
- Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T.W., y Swings. J. (2001). Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*. 91: 282-292.
- Dawe, D., Dobermann, A., Moya, P., Abduirachman, S., Singh, B., Lal, P., Li, S.Y., Lin, B., Panaullah, G., Sariam, O., Singh, Y., Swarup, A., Tan, P.S. y Zhen, Q. X.

- (2000), How widespread are yield declines in long-term rice experiments in Asia? *Field Crops Research*. 66 (2): 175-193.
- Diaz, R. J. y Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*. 321: 926-929.
- Dilworth, M. J. (1974). Dinitrogen fixation. *Annual Review of Plant Physiology*. 25: 81-114.
- Etesami, H., Alikhani, H. A. y Hosseini, H. M. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*. 2: 72-78.
- Ferreira, J. S., Baldani, J. I. y Baldani, V. L. D. (2010). Seleção de bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. *Acta Scientiarum Agronomy*. 32: 179–185.
- Fierer, N. y Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 626-631.
- Fuentes-Ramirez, L. E. y Caballero-Mellado, S. (2005). Bacterial Biofertilizers. In: Z. A. Siddiqui (Ed.). PGPR: Biological control and biofertilization (p. 143-172). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K. y Nelson, L. M. (2005). Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: Siddiqui, A. (Ed). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. Netherlands, pp. 173-195.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, *Scientifica*. Article ID 963401, 15p.
- Gravel V., Antoun, H. y Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 1968-1977.
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A. y Park, S. W. (2013). Plant-growth promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *The Journal of Plant Growth Regulation*. 32: 245-258.
- Habib, S. H., Kausar, H., Saud, H. M., Ismail, M. R. y Othman, R. (2016). Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for

- growth enhancement of rice. *International Journal of Agriculture and Biology*. 18: 184-191.
- Hardarson, G. y Atkins, C. (2003). Optimising biological N₂ fixation by legumes in farming systems. *Plant and soil*. 252: 41-54.
- INIA, Instituto Nacional de Innovación agraria. (2016). *PNIA en arroz*. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/programas/arroz>.
- IRRI, International Rice Research Institute. (2016). <http://irri.org/our-work/research/rice-and-the-environment>
- Ji, S. H., Gururani, M. A. y Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. 169: 83-98.
- Kantachote, D., Nunkaew, T., Kantha, T. y Chaiprapat, S. (2016). Biofertilizers from *Rhodopseudomonas palustris* strains to enhance rice yields and reduce methane emissions. *Applied Soil Ecology*. 100: 154-161.
- Lugtenberg, B. J., Chin, A-Woeng, T. F. y Bloemberg, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 1-25.
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *The Annual Review of Microbiology*. 63: 541-556.
- Marra, L. M., de Oliveira, S. M., Soares, C. R. F. S. y Moreira F. M. S. (2011). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains form tropical legumes. *Scientia Agrícola (Piracicaba, Brazil)*. 68: 603-609.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. y Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 10 (3): 293–319.
- Ministerio de Agricultura. (2012). El arroz: Principales aspectos de la cadena productiva. Dirección General de Competitividad Agraria. Primera edición. Lima-Perú.
- Mishra, A. K., Mottaleb, K. A., Khanal, A. R. y S. Mohanty. (2014). Abiotic stress and its impact on production efficiency: The case of rice farming in Bangladesh. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 199: 146-153.

- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T. y Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33 (4-5): 603-612.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 265-270.
- Novais, R. F. y Smith, T. J. (1999). Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 399p.
- Nunkaew, T., Kantachote, D., Nitoda, T. y Kanzaki, H. (2015). Selection of salt tolerant purple nonsulfur bacteria producing 5-aminolevulinic acid (ALA) and reducing methane emissions from microbial rice straw degradation. *Applied Soil Ecology*. 86: 113-120.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. y Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*. 160: 127-133.
- Phetcharat, P. y Duangpaeng, A. (2012). Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole Acetic Acid Production. *Procedia Engineering*. 32: 177-183.
- Pramer, D. y Schmidt, E. L. (1966). Experimental Soil Microbiology. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN. 106p.
- Rawat, S. K., Singh, R. K. y Singh, R. P. (2012). Remediation of nitrite contamination in ground and surface waters using aquatic macrophytes. *Journal of Environmental Biology*. 33: 51-56.
- Ramirez-Bahena, M. H, Salazar, S., Velázquez, E., Laguerre, G. y Peix, A. (2016). Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria associated with pea (*Pisum sativum* L.) isolated from two agricultural soils. *Symbiosis*. 67: 33-41.
- Sarathambal, C., Llamurugu, K., Balachandar, D., Chinnadurai, C. y Gharde, Y. (2015). Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. *Applied Soil Ecology*. 87: 1-10.
- Shakeel, M., Rais, A., Hassan, MN. y Hafeez, F. Y. (2015). Root associated *Bacillus* sp. Improves growth, yield and zinc translocation for basmati rice (*Oryza sativa*) varieties. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1286. doi: 10.3389/fmicb.2015.01286.

- Spaepen, S., Vanderleyden, J. y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology reviews*. 31 (4): 425-248.
- SIEA, Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias. (2016). <http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=publicaciones/anuarios-estadisticos>.
- Soil Survey Staff. (2009). Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigations Report No. 51, Version 1.0. R. Burt (ed). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- Somers, E., Vanderleyden, J. y Remans, R. (2004). Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 205-240.
- USDA, United States Department Agrary. (2016). <http://www.ers.usda.gov/publications/rcs-rice-outlook.aspx>
- Vessey, J.K. (2003). Plant Growth promoting rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Wilson, P.W. y Knight, S.C. (1952). Experimentals in bacterial physiology. Burgess, Minneapolis. USA. 49p.