

Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de las rizobacterias de *Neltuma pallida* en el bosque seco de Piura, Perú: pruebas en laboratorio y efecto en la germinación de semillas

Evaluation of the plant growth promoting capacity of rhizobacteria of Algarrobo *Neltuma pallida* from dry forest of Piura – Perú, Laboratory and effect of seed germination

Fernando Abilio Merino Rafael ^a , Liz Pamela Jaramillo Calle ^{b*} 

^a Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, Lima, Perú.

* Autor de correspondencia: ^b Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima, Perú, liz.jaramillo@unmsm.edu.pe

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio es aislar, seleccionar y determinar la capacidad promotora del crecimiento vegetal de rizobacterias en el tocón y el árbol de algarrobo a nivel de laboratorio y de semillas, con el fin de poder tener un banco de cepas que pueda usarse para la reforestación del bosque seco en Piura. Se obtuvieron dos muestras compuestas de suelo rizosférico: una de tocones (árboles talados) y otra de árboles de algarrobo, de las cuales se aislaron 16 y 18 cepas bacterianas, respectivamente. A nivel de laboratorio, se evaluó la capacidad de fijar nitrógeno libre y producir ácido indolacético, actividad celulolítica y solubilizadora de fosfatos. Por cada muestra de suelo se escogieron cinco cepas con propiedades no antagonistas sino más bien complementarias entre sí, para hacer un inoculante líquido y evaluar su efecto en la germinación de semillas. Se encontraron porcentajes de germinación de 53 % para tocones, 37 % para árboles y 34 % para el control (agua). Las cepas de los inoculantes fueron identificadas molecularmente como un *Actinomicetos* y otras cepas de *Bacillus* sp., *B. paramycoides*, *B. wiedmannii*, *B. thuringiensis* y *B. subtilis*. Por lo tanto, se demostró que la rizosfera de algarrobo de bosque seco, ya sea como árbol o tocón, es una fuente importante de rizobacterias con capacidad promotora del crecimiento vegetal, que puede ser usada para reforestar el bosque seco.

Palabras clave: suelo rizosférico, tocones, inoculante, *Bacillus*, *Actinomicetos*.

SUMMARY

The main goal of this study is to isolate, select and determine the growth plant promoting ability of rhizobacteria in the stump and in the carob tree at the laboratory and seed level in order to have a bank of strains that can be used for the reforestation of the dry forest in Piura. Two composite samples of rhizosphere soil were obtained: one from stumps (felled trees) and the other from algarrobo trees, of which 16 and 18 bacterial strains were isolated, respectively. Measurements at a laboratory level included free nitrogen fixation, indolacetic acid, cellulolytic, and phosphate solubilizing production capacity. For each soil sample, five strains were selected with complementary (not antagonistic) properties to make an inoculating liquid and evaluate its effect on seed growth: 53 % for stumps, 37 % for trees, and 34 % for control (water). Inoculant strains were molecularly identified as *Actinomycetes* and other strains as *Bacillus* sp., *B. paramycoides*, *B. wiedmannii*, *B. thuringiensis*, and *B. subtilis*. Therefore, it was demonstrated that the rhizosphere of a dry forest carob, whether as a tree or stump, is an important source of rhizobacteria with plant-promoting capacity, which can be used to reforest the dry forest.

Keywords: rhizosphere soil, stumps, inoculant, *Bacillus*, *Actinomycetes*.

INTRODUCCIÓN

Debido al aprovechamiento de los recursos que ofrece: frutos, hojas y madera, y dada su capacidad de adaptación y sobrevivencia a condiciones extremas como altas temperaturas y sequía, el algarrobo (*Neltuma pallida* Humb. &

Bonpl. ex Willd. C.E. Hughes & G.P. Lewis) tiene un gran valor económico y ecológico. Esto convierte al algarrobo en una especie clave del bosque seco peruano (Juárez y González 2020, Rivera *et al.* 2020, Hughes *et al.* 2022, Escobar *et al.* 2023, Joseau *et al.* 2023). El bosque seco peruano se encuentra principalmente en los departamentos

de Tumbes, Piura, Lambayeque y el norte de la Libertad (Rivera *et al.* 2020); sin embargo, debido a actividades humanas como la deforestación, cambio de uso de suelo y tala ilegal, el bosque seco y sus algarrobos se están acabando (Cuentas y Salazar 2017).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, denominadas PGPR debido a sus siglas en inglés, son microorganismos que habitan la rizósfera (porción del suelo que rodea a la raíz de la planta), los cuales, mediante interacciones complejas con mecanismos directos e indirectos, proporcionan metabolitos como auxinas, citoquininas, giberelinas, fijan nitrógeno y solubilizan fósforo (dos nutrientes fundamentales para las plantas). También, actúan como antagonistas y controladores de patógenos de plantas al competir por espacio, producir antibióticos y enzimas líticas (Benjumeda 2017, Beshah *et al.* 2023). Además, son fundamentales en el ciclo de carbono mediante la degradación de polisacáridos complejos como celulosa en azúcares más simples (Tang *et al.* 2020). Debido a la importancia de las PGPR en la fertilidad del suelo, se recomienda su uso mediante inoculantes en las zonas que se desea reforestar (Benjumeda 2017). Sin embargo, en Perú en los planes de reforestación de bosque seco, no se considera el uso de los recursos microbianos de su rizosfera (SERFOR 2018), a diferencia de otros países en los cuales, cuando se realiza reforestación, la herramienta biotecnológica básica utilizada son los microorganismos de la rizosfera (Aguirre *et al.* 2021, Gómez *et al.* 2021), esto quizás se debe a los pocos estudios sobre rizobacterias en especies forestales de bosque seco.

En Perú, en bosque seco, se ha reportado estudios de rizobacterias en dos especies forestales: guayacanes y algarrobo; guayacanes en Tumbes (Llacsá 2016) y algarrobo solamente en Tumbes y Lambayeque (García 2020, Reinoso y Valladolid 2020). No se ha reportado la creación de un banco de PGPR para uso forestal. Además, no se ha señalado haber realizado los estudios en viveros de producción forestal local, lo cual implica difundir el conocimiento científico de manera más directa e involucrar a la población usuaria potencial. La investigación de rizobacterias de algarrobo, la creación de un banco de PGPR y la difusión del conocimiento científico involucrando a la población usuaria local, son fundamentales si se plantea utilizar rizobacterias para reforestar el bosque seco en Perú. Es por ello que el presente estudio tiene como objetivo principal aislar, seleccionar y determinar la capacidad promotora de crecimiento vegetal a nivel de laboratorio y de vivero de PGPR de la rizosfera del tocón y del árbol de algarrobo, con el fin de poder tener un banco de cepas que pueda usarse para la reforestación del bosque seco en la región de Piura.

MÉTODOS

Elección del lugar para la toma de muestra. Se seleccionó un área de 20 x 25 m, aproximadamente, en el caserío de

Pedregal, distrito Tambo Grande, región de Piura, coordenadas 4° 52' 52" S y 80° 23' 7" O, de propiedad privada, el cual formó parte del bosque seco que fue deforestado debido tanto al cambio de uso de suelo para agricultura como al crecimiento demográfico. De cada árbol y tocón (árbol talado) encontrado, se tomaron muestras de suelo rizosférico de las raíces laterales, a una profundidad de 30 a 50 cm aproximadamente; las muestras se integraron para formar muestras compuestas, las mismas que fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología y Ecología Ambiental, de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, para su inmediato procesamiento.

Aislamiento y selección de cepas. En condiciones de esterilidad, se hizo diluciones seriadas hasta 10⁻⁵. Las dos últimas diluciones se sembraron en cinco placas, tras lo cual a estas dos últimas diluciones se les practicó shock térmico y se sembraron en cinco placas más. En esta prueba se buscó aislar grupos de microorganismos fijadores de nitrógeno libre; para ello, se usó agar Ashby manitol (compuesto por: KH₂PO₄ 0,2 g/L, MgSO₄ 0,2 g/L, NaCl 0,2 g/L, CaCO₃ 5 g/L, CaSO₄ 0,1 g/L, manitol 10 g/L y agar bacteriológico 15 g/L, pH 7). Las placas se incubaron a 28 °C durante siete días (Beltrán *et al.* 2017), se hizo la observación y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹). Seguidamente, se seleccionaron diversos tipos de colonias, pasando cada uno a caldo tripticasa de soya (TSB) (compuesto por: digerido enzimático de caseína 17 g/L, digestivo enzimático de soya 3 g/L, NaCl 5 g/L, K₂HPO₄ 2,5 g/L, C₆H₁₂O₆ 2,5 g/L, pH 7) y luego fueron purificadas en agar tripticasa de soya (TSA) (compuesto por: digerido enzimático de caseína 15 g/L, digestivo enzimático de soya 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L, pH 7). Con lo que se obtuvo un banco de cepas que fueron codificadas y preservadas a -20 °C y a 8 °C.

A continuación, se reactivaron las cepas para las siguientes pruebas.

Prueba de fijación de nitrógeno. Cada cepa fue sembrada mediante diseminación, utilizando espátula digralsky, en agar Ashby manitol (Zavala *et al.* 2020). Debido a que este medio está libre de nitrógeno, para que cada cepa pueda crecer, debe fijar el nitrógeno del aire que se encuentra encerrado en la placa petri. De este modo, pudimos comprobar su capacidad fijadora de nitrógeno libre de manera individual (Duque 2019).

Prueba de producción de ácido indol acético. Las cepas fueron sembradas en el caldo triptófano (compuesto por peptona de caseína 10 g/L, DL-Triptófano 1 g/L, Cloruro de sodio 5 g/L, pH 7), incubadas por 72 horas a 28 °C, centrifugadas a 2.000 rpm durante 30 minutos (Alcarraz *et al.* 2019). Manteniendo la proporción de 1:2 para muestra y reactivo, se tomó 250 µL del sobrenadante de cada cepa y se las sometió a reacción con 500 µL del reactivo de Salkowsky (compuesto por 2 % de FeCl₃ 0,05 M en 35 % de ácido perclórico) (Rico 2009) y luego se los llevó a

oscuridad por treinta minutos a 28 °C. Simultáneamente, se usó un control con caldo sin bacteria y reactivo (color amarillo claro). Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura y se observó el cambio de coloración, de amarillo claro a marrón claro, lo esperable para una reacción positiva (Mantilla 2007).

Capacidad Celulolítica. Cada cepa fue sembrada por triplicado en el medio de cultivo agar carboximetil celulosa (CMC) (compuesto por K_2HPO_4 1,0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L; NaCl 0,5 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,01 g/L, NH_4NO_3 0,3 g/L; carboximetil celulosa 10 g/L y agar bacteriológico 17 g/L, pH 7). Se incubaron por siete días a 28 °C y se revelaron los halos de hidrólisis utilizando una solución de rojo de congo al 1 % y NaCl 1M (Samira *et al.* 2011). Se tomaron medidas del tamaño del halo (Th) y del tamaño de la colonia (Tc), a partir de las cuales se calculó el radio de hidrólisis (RH) (ver ecuación [1]) (Sánchez *et al.* 2020).

$$RH = \frac{Th}{Tc} \quad [1]$$

Capacidad Solubilizadora de fosfatos. Esta prueba se realizó por triplicado, para lo que se empleó medio Pikovskaya (PVK) (compuesto por extracto de levadura 0,5 g/L, $C_6H_{12}O_6$ 10 g/L; $Ca_3(PO_4)_2$ 5 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g/L; KCl 0,2 g/L; $MgSO_4$ 0,1 g/L; $MnSO_4$ 0,0001 g/L; $FeSO_4$ 0,0001 g/L; agar bacteriológico 15 g/L, pH 7). Las placas petri se incubaron a 28°C durante siete días y se consideró como indicador de la capacidad solubilizadora de fosfato la formación de un halo transparente alrededor de la colonia. Para cada cepa se determinó el índice de solubilización de fosfatos (IS) (ver ecuación [2]) (Beshah *et al.* 2023), para lo cual se tomó medidas de la zona del halo (Zh) y del diámetro de la colonia (Dc).

$$IS = \frac{Z_h + D_c}{D_c} \quad [2]$$

Identificación taxonómica. Para este efecto, se utilizó tinción Gram, morfología celular y pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa; las cepas que se usaron en inoculantes para evaluar la germinación de semillas fueron identificadas mediante método molecular de secuenciación de ADN (GEN 16S ARNr), estableciendo el árbol filogenético con el software MEGA versión 11 -Tamura K, Stecher G. y Kumar S - 2021.

Selección de cepas para inoculante. Se seleccionó cepas con resultados positivos para tres de las cuatro pruebas evaluadas y se les realizó adicionalmente una prueba de antagonismo mediante la técnica de inhibición simultánea (Pérez-y-Terrón *et al.* 2014).

Preparación del inoculante. Los cultivos jóvenes de cada cepa seleccionada, fueron inoculados en un matraz con

caldo TSB, incubados 28 °C durante veinticuatro horas, con agitación manual cada seis horas; al final de la incubación, se determinó la concentración celular mediante recuento en placa y se expresaron los resultados en UFC mL^{-1} (Acosta y Leguizamo 2020). Finalmente se preparó una mezcla que fue incorporada en un frasco de vidrio ámbar, guardado en refrigeración hasta su posterior uso.

Germinación de semillas en vivero. El ensayo se realizó en el vivero “El huerto”, localizado en el centro poblado Huaca Blanca, distrito de Tambo Grande, provincia y departamento de Piura, coordenadas 4° 54' 25" S y longitud 80° 20' 33" O. El suelo fue desinfectado mediante solarización, tras lo cual se depositó en bolsas plásticas de almáximo de 1,5 kg aproximadamente; las que fueron colocadas en diez columnas por treinta filas, en un área aislada y a temperatura ambiental (28 - 30 °C). Las semillas pasaron por escarificación biológica de ovinos, luego se desinfectaron durante cinco minutos con hipoclorito de sodio al 1 % y se enjuagaron con agua destilada estéril. Los inoculantes fueron retirados de la cadena de frío dos horas antes de la inoculación. Se evaluó tres tratamientos: agua estéril, inoculante de cepas de rizosfera de tocones de algarrobo e inoculante de cepas de árboles de algarrobo, y se empleó 1 mL de tratamiento por cada semilla. Los contenidos de las bolsas sembradas e inoculadas fueron regados y evaluados cada cinco días durante un mes.

Diseño Experimental. El diseño experimental usado fue establecido completamente al azar, y se probaron tres tratamientos, donde cada uno contó con una unidad experimental de veinte semillas y cinco repeticiones.

Análisis de datos. Los resultados se analizaron usando el software R para inferencias estadísticas y Excel para el análisis estadístico descriptivo. Se empleó ANOVA y Tuckey cuando fue necesario ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

Toma de muestra, aislamiento y selección de cepas. Se tomaron muestras de suelo rizosférico de tocones (árboles talados) y árboles de algarrobo, con las cuales se prepararon dos muestras compuestas. A partir de las dos muestras, se determinó el promedio de microorganismos fijadores de nitrógeno libre (UFC g^{-1}) y se seleccionaron cepas bacterianas de cada muestra. Se determinó $P = 0,0001$ y según la prueba de Tuckey las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (tabla 1).

Prueba de fijación de nitrógeno y de producción de ácido indolacético. Los resultados obtenidos de la reacción positiva para cada prueba, se muestran en la tabla 2.

Capacidad celulolítica. Los radios de hidrólisis promedio encontrados tuvieron valores dentro de un rango de 0,33 -

2,13. Se determinó $P = 0,0001$ y según la prueba de Tukey las letras diferentes indican diferencias significativas (tabla 3).

Capacidad solubilizadora de fosfatos. Los índices de solubilización de fosfatos promedio encontrados tuvieron valores dentro de un rango de 6,64 - 6,78. Se encontró $P = 0,002$ y según la prueba de Tukey las letras diferentes indican diferencias significativas (tabla 4).

Identificación taxonómica. Mediante pruebas moleculares, se identificaron cinco cepas de cada muestra, encontrándose nueve cepas del género *Bacillus* y una cepa de actinomiceto (tabla 5).

Selección de cepas para inoculante. De cada muestra se seleccionaron cinco cepas, las cuales no son antagonistas entre sí y tienen propiedades que se complementan (tabla 6).

Tabla 1. Fijadores de nitrógeno UFC g⁻¹ y cepas seleccionadas para cada muestra.
Nitrogen fixers UFC g⁻¹ and strains selected for each sample.

| Muestras | Fijadores de nitrógeno UFC g ⁻¹ *** | Cepas seleccionadas |
|-----------------------------------|--|---------------------|
| Muestra N° 1 tocones de algarrobo | 10,6 x 10 ^{4a} | 16 |
| Muestra N° 2 árboles de algarrobo | 36,8 x 10 ^{4b} | 18 |

*** = $P < 0,001$.

Tabla 2. Reacción positiva para la prueba fijación de nitrógeno y de producción de ácido indolacético.
Positive reaction for nitrogen fixation and indole acetic acid production test

| Muestra | Fijación de Nitrógeno | Producción de ácido indolacético ⁺ |
|-----------------------------------|-----------------------|---|
| Muestra N° 1 tocones de algarrobo | 100 % | 50 % |
| Muestra N° 2 árboles de algarrobo | 100 % | 44 % |

⁺ Desviación estándar: 0,0424

Tabla 3. Radio de hidrólisis para cada cepa.
Hydrolysis radius for each strain.

| Muestra N° 1: Tocones de algarrobo | | Muestra N° 2: Árboles de algarrobo | |
|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Cepa | Radio de hidrólisis*** | Cepa | Radio de hidrólisis*** |
| M1C6 | 1,02 ^{bc} | M2C1 | 0,49 ^c |
| M1C10 | 0,96 ^{bc} | M2C2 | 0,45 ^c |
| M1C11 | 0,54 ^c | M2C7 | 1,21 ^{abc} |
| M1C13 | 1,88 ^{ab} | M2C10 | 0,33 ^c |
| M1C14 | 2,13 ^a | M2C13 | 0,47 ^c |
| | | M2C14 | 0,58 ^c |

*** = $P < 0,001$.

Tabla 4. Índice de solubilización de fosfatos para cada cepa.
Phosphate solubilization rate for each strain.

| Muestra N° 1: Tocones de algarrobo | | Muestra N° 2: Árboles de algarrobo | |
|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| Cepas | Índice de solubilización de fosfatos** | Cepas | Índice de solubilización de fosfatos** |
| M1C2 | 2,64 ^c | M2C9 | 5,00 ^{ab} |
| M1C6 | 4,44 ^{ab} | M2C11 | 6,33 ^a |
| M1C14 | 6,78 ^a | | |

** = $P < 0,01$

Tabla 5. Identificación taxonómica de las cepas de la muestra 1 y 2.

Taxonomic identification of the sample strains 1 y 2.

| Muestra N° 1 Tocones de algarrobo | Nombre científico | Muestra N° 2 Árboles de algarrobo | Nombre científico |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|------------------------------------|
| M1C2 | <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner | M2C1 | <i>Bacillus paramycooides</i> |
| M1C6 | <i>Bacillus paramycooides</i> Liu | M2C2 | <i>Bacillus subtilis</i> Ehrenberg |
| M1C10 | <i>Bacillus wiedmannii</i> Miller | M2C11 | <i>Bacillus wiedmannii</i> |
| M1C11 | <i>Bacillus</i> sp. <i>SK_C-3</i> | M2C13 | <i>Actinomycetia bacterium</i> UB |
| M1C14 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | M2C14 | <i>Bacillus wiedmannii</i> |

Tabla 6. Cepas seleccionadas para inoculante.

Strains selected for inoculant.

| Cepa | Nombre científico | Prueba de Fijación de nitrógeno | Prueba de Ácido indol acético | Capacidad celulolítica | Capacidad Solubilizadora de fosfatos |
|-------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| M1C2 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | + | + | - | + |
| M1C6 | <i>Bacillus paramycooides</i> | + | - | + | + |
| M1C10 | <i>Bacillus wiedmannii</i> | + | + | + | - |
| M1C11 | <i>Bacillus</i> sp. <i>SK_C-3</i> | + | + | + | - |
| M1C14 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | + | - | + | + |
| M2C1 | <i>Bacillus paramycooides</i> | + | + | + | - |
| M2C2 | <i>Bacillus subtilis</i> | + | + | + | - |
| M2C11 | <i>Bacillus wiedmannii</i> | + | + | - | + |
| M2C13 | <i>Actinomycetia bacterium</i> | + | + | + | - |
| M2C14 | <i>Bacillus wiedmannii</i> | + | + | + | - |

Tabla 7. Concentración promedio para cada inoculante.

Average concentration for each inoculant.

| Muestras | UFC mL ⁻¹ ns |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Muestra N° 1 tocones de algarrobo | 202,47 x 10 ⁷ |
| Muestra N° 2 árboles de algarrobo | 197,93 x 10 ⁷ |

ns = no significativo.

Preparación del inoculante. La concentración promedio de cada inoculante (UFC mL⁻¹) no fue un factor que influyó en el resultado, puesto que se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se halló $P = 0,585$.

Germinación de semillas en vivero. Los tres tratamientos probados mostraron germinación en el quinto día y dejaron de germinar a los quince días; el mismo porcentaje de germinación en las lecturas de los días 20, 25, y 30 se mantuvo (figura 1).

DISCUSIÓN

Este estudio tiene una sola zona de muestreo, debido a que se ha llevado a cabo durante la época de pandemia, con restricciones para movilizarse y tener contacto con la población. Sin embargo, se ha realizado en un área donde se evidencia la deforestación por tala para uso en carbón vegetal, cambio de uso de suelo para agricultura y crecimiento demográfico, factores regionales que afectan al bosque seco y su especie clave el algarrobo. Además, pese a las restricciones los ensayos en germinación de semillas se realizaron en un vivero local, lo cual permite tener condiciones climáticas de la zona de muestreo, compartir e intercambiar experiencia y conocimiento con las personas de la comunidad, de modo tal que vean el uso de microorganismos como una herramienta para mejorar la producción de plantines para reforestación. Esta es una fortaleza debido a que muchas investigaciones se realizan en laboratorio pero no se comparten de manera vivencial con la población usuaria potencial, por lo que se espera que esta investigación motive a nuevos estudios y la apli-

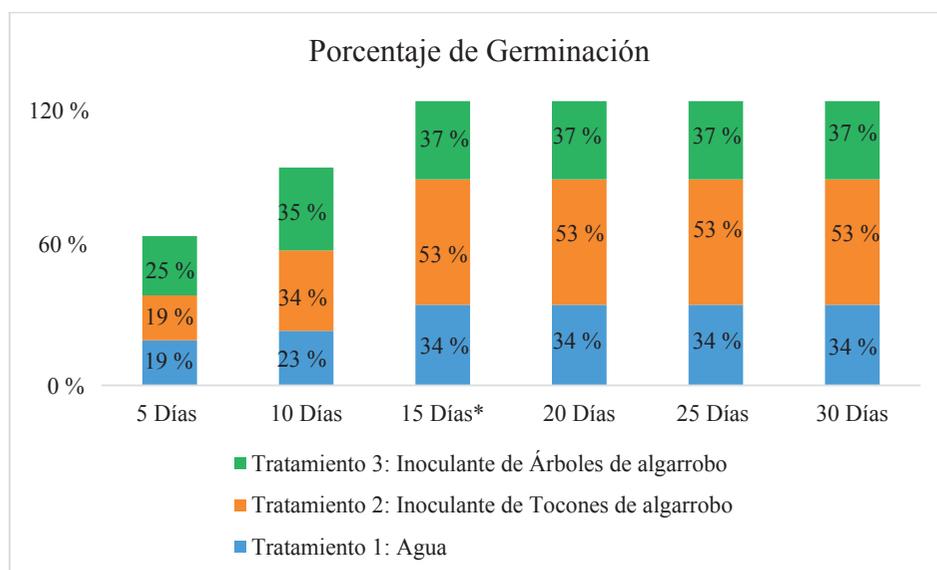


Figura 1. Porcentajes de germinación de los tratamientos. * Desviación estándar: 10,2143.

Germination percentages of treatments. * Standard deviation: 10.2143.

cación de los conocimientos obtenidos para la producción de plantines en vivero de la región. Debido a que no hay muchos reportes del uso de rizobacterias del algarrobo y en el estudio realizado por García León (2020), se escogió árboles sin daño mecánico, este estudio contribuye al conocimiento debido a que se reporta rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), tanto en árboles como en tocones (árboles talados), con lo que se demuestra que, pese al daño mecánico sufrido, los tocones son una fuente aprovechable de recursos microbianos.

Los resultados del conteo de UFC g^{-1} de fijadores de nitrógeno son mayores a los reportados en un estudio en suelo sin revegetalización y con revegetalización realizada en Colombia por Beltrán *et al.* 2017. Esto debido a que para tocones de algarrobo el conteo es de 5,03 Log UFC g^{-1} ($10,6 \times 10^4$ UFC g^{-1}) y para zona sin revegetalización se reporta 4,42 Log UFC g^{-1} , en el caso de árboles de algarrobo tenemos 5,57 Log UFC g^{-1} ($36,8 \times 10^4$ UFC g^{-1}) el cual es mayor a 4,38 Log UFC g^{-1} reportado en zona revegetalizada. La diferencia entre los conteos de fijadores de nitrógeno hallados en árboles de algarrobo y tocones de algarrobo es de $26,2 \times 10^4$ UFC g^{-1} , lo cual nos indica que, al talar un árbol disminuye la cantidad de microorganismos en su rizósfera, coincidiendo con en el estudio realizado por Cordero *et al.* (2017) donde señalan que la deforestación reduce la abundancia de microorganismos rizosféricos de Tara, *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Respecto a la prueba de fijación de nitrógeno, se constata que el 100 % de las cepas aisladas tienen esta capacidad, estos resultados coinciden con los encontrados en rizobacterias de café (Alcarraz *et al.* 2019) y son mayores a los encontrados en rizobacterias de árboles de bosque rehabilitado donde se reporta 30,8 % de las cepas aisladas

(Tang *et al.* 2020). Para la prueba de ácido indolacético, los resultados hallados son menores a los reportados en rizobacterias de café (83,3 %), maní (72,2 %), manglar (44,4 %) y eucalipto (96 %) (Alcarraz *et al.* 2019, El-Tarabily *et al.* 2021, Zul *et al.* 2022, Beshah *et al.* 2023). El porcentaje de cepas con actividad celulolítica encontrado en tocones fue de 31,25 % y en árboles fue 33,33 %. Resultados mayores al reportado en rizobacterias de árboles de bosque rehabilitado donde se reporta 22,58 % (Tang *et al.* 2020). En cuanto a los radios de hidrólisis, estos son menores a los reportados en cepas celulolíticas de humedales de Bogotá que van de 0,38 hasta 6,5 (Sánchez *et al.* 2020). El porcentaje de cepas con actividad solubilizadora de fosfatos encontrado en tocones fue 18,75 %, mientras que en árboles se encontró 11,11%, ambos menores a lo reportado en rizobacterias de suelo de Bosque Alto Andino y del corredor Chingaza – Sumapaz en Bogotá, donde se reportó 27,77 % de cepas solubilizadoras de fosfato con capacidad PGPR para posible uso en restauración ecológica (Pérez y Catama 2018). En el caso de tocones en este estudio se reporta un mayor porcentaje de cepas con actividad solubilizadora de fosfatos en comparación al 15 % reportado en rizosfera de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. (cedro andino), de bosques montanos de la cordillera occidental de Ecuador afectados por deforestación (Ascencio *et al.* 2021). Los índices de solubilización de fosfatos de este estudio tienen valores que varían entre 2,64 y 6,78, los cuales son mayores a los reportados en bacterias de rizosfera de *Baccharis macrantha* Kunth y *Viburnum tryphyllum* Bentham de pastizales deteriorados que presentaron valores entre 1,1 y 33,7 (Ávila *et al.* 2015), bacterias de rizosfera de árboles de bosque rehabilitado que presentó valores entre 1,66 y 4,21 (Tang *et al.*

2020) y de rizobios de maní con valores entre 1,7 y 2,45 (Beshah *et al.* 2023).

La identificación molecular nos indica cepas de género *Bacillus* y un actinomiceto; el género *Bacillus* es reportado como fijador de nitrógeno, productor de ácido indolacético, solubilizador de fosfatos y productor de enzimas celulolíticas (Ávila *et al.* 2015, Anguiano 2019, García 2020), también como bacterias PGPR, con efectos benéficos en germinación y con capacidad de mejorar la adaptación de las plantas en suelos con estrés por sequía en zonas áridas (Armada 2015, Chávez *et al.* 2016, Castillo *et al.* 2022). Los actinomicetos son reconocidos como PGPR (García *et al.* 2019, Ramírez *et al.* 2019, Lino *et al.* 2020), pero no se encuentran reportes de su presencia en rizosfera de algarrobo, siendo el presente estudio el primer reporte sobre el particular. Asimismo, se reporta como PGPR cepas de *B. paramycoides*, *B. wiedmannii*, lo cual coincide con un estudio reciente sobre PGPR de rizosfera de diversas plantas de cultivo en Jiansu, China (Osman y Yin 2018).

La diferencia de porcentajes de germinación respecto al testigo, hallada en este estudio, fue de 19 % y 3 % para el inoculante a base de cepas de tocones y de árboles respectivamente; ambos valores, son menores a los reportados en el estudio de germinación de *Neltuma chilensis* (Molina) CE Hughes & GP Lewis inoculado con *B. amyloliquefaciens* Priest donde se encontró una diferencia de 20 % (Villegas *et al.* 2014). Sin embargo, lo encontrado para cepas de tocones es mayor a lo reportado en el estudio de la germinación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (especie forestal no maderable), donde se utilizó un inoculante de cepas del género *Bacillus* y se reportó una diferencia de 12,7 % (Castillo *et al.* 2022); este resultado también es mayor al reportado en el estudio realizado en México, en el estado de Querétaro, en una zona árida con condiciones climáticas similares a la zona de este estudio, en donde se aisló *B. flexus* y *B. megaterium* de Bary, de cactáceas y en el cual se reportó una diferencia de porcentaje de germinación respecto al control de 6,4 % y 4 %, respectivamente (Chávez *et al.* 2016). La notable diferencia en el porcentaje de germinación en los inoculantes utilizados, tocones 53 % frente a árboles 37 %, podría deberse a que el inoculante de cepas de tocones tiene dos cepas de *Bacillus thuringiensis*, mientras que el inoculante de cepas de árboles no tiene esta especie. *Bacillus thuringiensis* ha sido reportado como controlador biológico de hongos que afectan la germinación de semillas, como lo señala un estudio en el que se infectó semillas de chile (*Capsicum annum* L.) con *Rhizoctonia solani* JG Kühn, donde las cepas de *Bacillus thuringiensis* lograron porcentajes de germinación de 25 % a 100 % (Mojica *et al.* 2009). Otra posible explicación a la diferencia de porcentajes de germinación sería que el inoculante de cepas de tocones tiene hasta cuatro cepas con capacidad celulolítica, de las cuales una de ellas, la cepa *Bacillus thuringiensis*, tiene el mayor valor de radio de hidrólisis de celulosa reportado en este estudio; ya que, actualmente, se considera la capacidad celulolítica

como una característica deseable en PGPR porque las celulasas permiten descomponer polisacáridos complejos en azúcares simples (Tang *et al.* 2020), lo cual ayuda al establecimiento y proliferación de las cepas bacterianas que favorecen la germinación de las semillas.

CONCLUSIONES

La rizosfera de algarrobo *Neltuma pallida*, ya sea de árboles o de tocones, es una fuente importante de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), con las propiedades de fijar nitrógeno y producir ácido indolacético, capacidad celulolítica y solubilizadora de fosfato inorgánico; propiedades que permiten una mejor germinación de semillas, por lo que las PGPR pueden ser usadas en la preparación de plantines para reforestar el bosque seco. En este estudio se reporta la presencia de los géneros actinomiceto y *Bacillus*, con cepas como *Bacillus thuringiensis*, *B. paramycoides*, *B. wiedmannii* y *B. subtilis*, las cuales logran un mayor porcentaje de germinación de semillas de algarrobo.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Fernando Abilio Merino Rafael realizó la corrección del diseño del proyecto, así como la supervisión y control de la ejecución del proyecto, Liz Pamela Jaramillo Calle planteó y ejecutó el proyecto; ambos analizaron los resultados y elaboraron el presente artículo.

FINANCIAMIENTO

La ejecución de este proyecto fue con recursos propios.

REFERENCIAS

- Acosta A, EJ Leguizamo. 2020. Métodos y técnicas de cuantificación microbiana empleados en la industria de alimentos, farmacéutica, agrícola y ambiental. *Revisión sistemática de la literatura*. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 46p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/52072>
- Aguirre M, J Pérez Moreno, NE López Lozano, JIJ Barragán, J Delgadillo. 2021. La inoculación de *Pinus greggii* con el hongo ectomicorrícico *Laccaria laccata* favorece a las comunidades nativas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Bioteconia* 23(2): 5–10.
- Alcarraz M, V Heredia, JP Julian. 2019. Cepas bacterianas nativas con actividades promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizosfera de *Coffea* spp. en Pichanaqui, Perú. *Bioteconología Vegetal* 19(4): 285–295.
- Anguiano Aguilar E. 2019. Aislamiento, selección y caracterización de bacterias con actividad celulolítica. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 107 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/2078/FAPJ-M-2019-0351.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Armada Rodríguez E. 2015. Efecto de microorganismos rizosféricos autóctonos (bacterias y hongos micorrízico arbusculares) sobre la tolerancia de las plantas al déficit hídrico en zonas semiáridas: mecanismos implicados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. 102 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://digibug.ugr.es/handle/10481/41123>
- Ascencio T, E Matamoros, V Sandoya, M Barcos, J Naranjo. 2021. Estudio Exploratorio de bacterias solubilizadoras de fósforo en dos hábitats asociados con *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. *Bionatura* 6(1): 1575–1578. DOI: <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.20>
- Ávila EG, LM Lizarazo, F Cortés. 2015. Promoción del crecimiento de *baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. *Acta Biologica Colombiana* 20(3): 121–131. DOI: <https://doi.org/10.15446/abc.v20n3.44742>
- Beltrán ME, ZE Rocha, AA Bernal, LA Pita. 2017. Microorganismos funcionales en suelos con y sin revegetalización en el municipio de Villa de Leyva, Boyacá. *Colombia Forestal* 20(2): 158–170. DOI: <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2017.2.a05>
- Benjumea Muñoz D. 2017. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones, Revisión Bibliográfica. Universidad de Sevilla, España. 44 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MUÑOZ%2C%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Beshah A, F Assefa, D Muleta, G Legese. 2023. Screening groundnut rhizobia for multiple plant growth promoting activities in Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research* 17(9): 212–220.
- Castillo F, D Castillo, JE Sáenz, A Rueda, JT Sáenz. 2022. Efectos del pretratamiento con Trichoderma y Bacillus en la germinación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 13(69): 56–72. DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.844>
- Chávez LA, A Hernández, JA Cabrera, L Luna, JR Pacheco. 2016. Aislados de Bacillus provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología* 48(4): 333–341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.001>
- Cordero I, B Ruiz, L Balaguer, A Richter, JJ Pueyo, A Rincón. 2017. Rhizospheric microbial community of *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze in conserved and deforested zones of the Atiquipa fog forest in Peru. *Applied Soil Ecology* 114: 132–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.AP-SOIL.2017.02.015>
- Cuentas MA, AI Salazar. 2017. De la especie al ecosistema; del ecosistema a la sociedad: revalorizando el algarrobo (*Prosopis pallida*) y el reto de su conservación en Lambayeque y en la costa norte del Perú. *Espacio y Desarrollo* 159(30): 129–159. DOI: <https://doi.org/10.18800/espacioydesarrollo.201702.006>
- Duque González JE, R López. 2019. Evaluación preliminar para aislamiento e identificación bioquímica de *Streptomyces* sp. a partir de un nicho ecológico del Campus Belmonte de la Universidad Libre, Seccional Pereira. Tesis de grado. Universidad Libre, Colombia. 23 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/17609/EVALUACION%20PRELIMINAR%20PARA%20AISLAMIENTO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- El Tarabily KA, A Sham, AA Elbadawi, AH Hassan, BKK Al-hosani, MA El-Esawi, AS Al Khajeh, SF AbuQamar. 2021. A Consortium of Rhizosphere-Competent Actinobacteria Exhibiting Multiple Plant Growth-Promoting Traits Improves the Growth of *Avicennia marina* in the United Arab Emirates. *Frontiers in Marine Science* 8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.715123>
- Escobar HA, DJ De Andrade, JJ Beard, R Ochoa. 2023. Description of a new species of spider mite of the genus *Tetranychus* *dufour* (Acari: Tetranychidae) from Peru. *Acarologia* 63(4): 1017–1029. DOI: <https://doi.org/10.24349/g1e1-le78>
- García León MF. 2020. Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociadas a la rizósfera de *Prosopis pallida* “algarrobo”. Tesis para optar a título profesional. Universidad Nacional de Tumbes, Perú. 64 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/123456789/2197/TESIS%20-%20GARCIA%20LEÓN.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García DE, P Vázquez, DA Pérez, MF Ruiz, DI Berlanga, JDJ Ornelas, CH Acosta, C Rios, MA Salas, E Osorio. 2019. Streptomyces como biocontroladores *in vitro* de *Exserohilum rostratum* y productores de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 48–56. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-2>
- Gómez BE, L Mejía, GM Ruiz. 2021. Bacterias benéficas del suelo para proteger y recuperar áreas naturales protegidas. *Temas de Ciencia y Tecnología* 25(74): 43–47. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://mmi.utm.mx/edicionanteriores/temas74/Bacterias.pdf>
- Hughes CE, JJ Ringelberg, GP Lewis, SA Catalano. 2022. Disintegration of the genus *Prosopis* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). *PhytoKeys* 205: 147–189. DOI: <https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.205.75379>
- Joseau MJ, S Rodriguez, J Frassoni. 2023. Advances in the Use of Neltuma (*ex* *Prosopis*) Pods for Human and Animal Consumption. In M Hasanuzzaman (Ed.), *Production and Utilization of Legumes - Progress and Prospects*, IntechOpen, www.intechopen.com. p 57–79.
- Juárez G, U González. 2020. Update taxonomic checklist of insects associated with *Prosopis pallida* (Humb. & bonpl. *ex* wild.) kunth (fabaceae) from Piura region, peru. *Graellsia* 76(2): 1–57. DOI: <https://doi.org/10.3989/graellsia.2020.v76.263>
- Lino M, E Morales, P Castellanos, M Acosta, M Soberon. 2020. Respuesta antifúngica y propiedades PGPB de actinomicetos aislados de cultivos de “vid” *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Arnaldoa* 27(2): 571–586.
- Llaca Sánchez LX. 2016. Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizósfera y filosfera de los guayacanes (*Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii*) y evaluación de cepas aisladas en el proceso inicial de desarrollo de plántulas. Tesis maestría. Universidad Nacional de Tumbes, Perú. 64 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://repositorio.concytec.gob.pe/server/api/core/bitstreams/e508e471-2f71-4e51-8f92-a16350a37b55/content>

- Mantilla Cardenas ME. 2007. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en periodo de enraizamiento. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 127 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8381/tesis35.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mojica V, H Luna, C Sandoval, B Pereyra, L Morales, N González, C Hernández, O Alvarado. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*, *FYTON* 78: 105–110.
- Osman NI, S Yin. 2018. Isolation and characterization of pea plant (*Pisum sativum* L.) growth-promoting Rhizobacteria. *African Journal of Microbiology Research* 12(34): 820–828. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8859>
- Pérez DM, JD Catama. 2018. Evaluación de *Rizobacterias solubilizadoras* de fosfato aisladas de Bosque Alto Andino para uso en restauración ecológica del corredor Chingaza – Sumapaz. Tesis de Grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia. 110 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/4800/INFORME%20FINAL%20GRADO.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Pérez y Terrón R, TS Gonzalez, J Muñoz. 2014. Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias* 2(3): 52–60.
- Ramírez IR, MA Garza, S Ramírez, IM Mendoza, L Galán, ME Aleman, G Rojas. 2019. Análisis de enzimas hidrolíticas en actinomicetos aislados de México y Canadá. *Revista de ciencias farmacéuticas y biomedicina* 46. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/252/243>
- Reinoza KJ, EA Valladolid. 2020. Especies de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de *Prosopis limensis* Bentham y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas bajo estrés salino. Tesis título profesional. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú. 125 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/8873>
- Rico Gallegos MA. 2009. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de Título Profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 152 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/item/9488ba6c-75d6-4534-9c01-5efaf602d4e3>
- Rivera JC, RM Cabrera, CF Bulnes. 2020. Micropropagación de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) Kunth a partir de yemas apicales. *Revista Colombiana de Biotecnología* 22(1): 18–26. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.70949>
- Samira M, R Mohammad, G Gholamreza. 2011. Carboxymethylcellulase and Filter-paperase Activity of New Strains Isolated from Persian Gulf. *Microbiology Journal* 1(1): 8–16. DOI: <https://doi.org/10.3923/mj.2011.8.16>
- Sánchez EM, JP Heredia, SM Buitrago, JP Medina. 2020. Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 22(1): 36–44. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>
- SERFOR (Servicio Forestal) 2018. Experiencias de Restauración en el Perú. Lecciones aprendidas, Ministerio Nacional de Agricultura y Riego & Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre, Eds. SERFOR, 1 ed. Lima, Perú. 132 p. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://repositorio.serfor.gob.pe/handle/SERFOR/493>
- Tang A, AO Haruna, NMA Majid, MB Jalloh. 2020. Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms* 8(3): 1–23. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030442>
- Villegas JA, EO Rueda, B Murillo, ME Puente, FH Ruiz, S Zamora, FA Beltrán. 2014. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(6): 1041–1053. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000600011
- Zavala J, M Alcarraz, J Julian. 2020. Evaluación para la producción de *Azotobacter* sp. promotor de crecimiento para cultivos de *Coffea arabica*. *Ciencia e Investigación* 23(1): 45–50. DOI: <https://doi.org/10.15381/ci.v23i1.18751>
- Zul D, M Elviana, KRN Ismi, KR Tassyah, BA Siregar, A Gafur, B Tjahjono. 2022. Potential of PGPR isolated from rhizosphere of pulpwood trees in stimulating the growth of *Eucalyptus pellita* F. Muell. *International Journal of Agricultural Technology* 18(1): 401–420. Consultado el 27 Jul. 2024. Disponible en <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/IJAT/10994972.pdf>

Recibido: 09/07/2023
Aceptado: 27/07/2024

