



Aislamiento e identificación de potenciales rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal de una planta nativa que crece en condiciones áridas

Isolation and identification of potential plant growth-promoting rhizobacteria of a native Arequipa plant that grows in arid conditions

Leslie Velarde-Apaza^{1,*}; Issaak Vásquez-Romero²; Joao De Souza-Pacheco^{3,4}; Richard Solórzano-Acosta^{4,5}; Guido Sarmiento-Sarmiento¹

¹ Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú.

² Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

³ Departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación - Ecofertilizing SAC. Lima, Perú.

⁴ Programa Doctoral en Ciencias e Ingeniería Biológica, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

⁵ Escuela de Agronomía, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

ORCID de los autores

L. Velarde-Apaza: <https://orcid.org/0000-0001-6031-6355>

I. Vásquez-Romero: <https://orcid.org/0000-0002-1044-2246>

J. De Souza-Pacheco: <https://orcid.org/0000-0002-3739-3122>

R. Solórzano-Acosta: <https://orcid.org/0000-0003-3248-046X>

G. Sarmiento-Sarmiento: <https://orcid.org/0000-0002-1420-2186>

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) son microorganismos benéficos que pueden ser utilizados para mejorar las respuestas de las plantas contra estrés bióticos y abióticos en los agrosistemas, mejorando la productividad agrícola y la calidad ambiental. En el presente estudio se identificaron bacterias con potencial rol en la promoción del crecimiento vegetal aisladas de la planta nativa *Glandularia clavata* (Ruiz & Pavon) Botta, distrito de Yarabamba, departamento de Arequipa, Perú. Dicha planta creció en un ambiente árido, en donde estuvo sometida a estreses abióticos como: hídrico, nutricional y ambiental. Las cepas aisladas fueron nombradas inicialmente como LDVA-01, LDVA-02 y LDVA-03, siendo bacilos Gram positivos, diplobacilos Gram negativos y cocobacilos Gram positivos, respectivamente. Las pruebas bioquímicas se realizaron en medios diferenciales. Finalmente, su identificación se confirmó mediante el secuenciamiento del gen ADN_r 16S y su posterior análisis filogenético, relacionando la cepa LDVA-01 con *Bacillus pumilus*, la cepa LDVA-02 con *Pseudomonas fluorescens* y la cepa LDVA-03 con *Rhodococcus erythropolis*. Debido a diferentes investigaciones que reportan actividad PGP a estas especies bacterianas, como adaptación de plantas cultivadas en condiciones edafoclimáticas desfavorables, las cepas aisladas de este trabajo podrían cumplir con estas características al favorecer el crecimiento de la planta nativa analizada.

Palabras clave: PGPR; *Glandularia*; *Bacillus*; *Pseudomonas*; *Rhodococcus*.

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial microorganisms that can be used to improve plant responses against biotic and abiotic stresses in agrosystems, improving agricultural productivity and environmental quality. In the present study, bacteria with a potential role in promoting plant growth were identified isolated from the native plant *Glandularia clavata* (Ruiz & Pavon) Botta, Yarabamba district, Arequipa department, Peru. This plant grew in an arid environment, where it was subjected to abiotic stresses such as: water, nutritional and environmental. The isolated strains were initially named LDVA-01, LDVA-02 and LDVA-03, being Gram positive bacilli, Gram negative diplobacilli and Gram positive coccobacilli, respectively. Biochemical tests were performed in differential media. Finally, its identification was confirmed by sequencing the 16S rDNA gene and its subsequent phylogenetic analysis, relating the LDVA-01 strain with *Bacillus pumilus*, the LDVA-02 strain with *Pseudomonas fluorescens*, and the LDVA-03 strain with *Rhodococcus erythropolis*. Due to different investigations that report PGP activity to these bacterial species, as an adaptation of plants grown in unfavorable edaphoclimatic conditions, the strains isolated from this work could meet these characteristics by favoring the growth of the native plant analyzed.

Keywords: PGPR; *Glandularia*; *Bacillus*; *Pseudomonas*; *Rhodococcus*.

1. Introducción

El distrito de Yarabamba se ubica al sur este de Arequipa, se encuentra en la parte baja de la subcuenca del río Polobaya, característico por terrenos con "precipitación marginal", con maleza desértica montañosa y estepa montañosa, uso apropiado para la agricultura y estepa y pastoreo temporal, pero la agricultura solo con irrigación (Rocha Miranda, 2015). En dicha localidad, la actividad agropecuaria se ve confinada por la escasa disponibilidad de agua de riego; así, las lluvias se presentan fuerte en el primer trimestre del año alcanzando una media anual de 159.25 mm/año (INEI, 2007), generando un importante desequilibrio hídrico, que añadido al uso ineficiente del agua en la agricultura, hacen que dicho ecosistema se vuelva peligrosamente frágil, incrementándose su fragilidad por la constante deforestación de tierras eriazas, que se produce por la extracción de especies arbóreas y arbustivas para la venta como combustible en la ciudad de Arequipa (Rocha Miranda, 2015). Entre las plantas que se observan en la localidad, tenemos a *Glandularia clavata*, que aparte de reportes botánicos (O'Leary & Mulgura, 2014), se desconoce algún beneficio que se le pueda obtener, como es el caso de otras especies del mismo género empleadas como ornamentales (Imhof, Suárez, Hick, Cáceres, Matoff, & Galetto, 2018), y también para la fitoremediación (Khandare & Govindwar, 2015); este último beneficio puede ser favorecido por la acción rizobacterias presentes, por lo que el aislamiento de estos se podría utilizar para el crecimiento de cultivos en regiones poco favorecidas.

Actualmente, existe una supresión de los recursos de la tierra acompañado del agotamiento de la riqueza biológica; por lo que la agricultura sostenible ha ido creciendo en interés. De esta forma, la disminución de la productividad de los cultivos se da principalmente por la incidencia de diversos estreses bióticos y abióticos, pudiendo llegar incluso hasta el 50-82% de pérdida de producción (Christensen et al., 2007). Los factores bióticos incluyen el estrés debido a insectos plaga y fitopatógenos. Los principales factores abióticos incluyen la sequía, la salinidad, los metales pesados, las temperaturas altas y bajas. La producción requerida de los cultivos en todo el mundo requiere un uso extensivo de fertilizantes, pesticidas y riego frecuente, lo que finalmente agota los nutrientes del suelo disponibles (Kumar, Patel, Meena, & Srivastava, 2019). Además, los agroquímicos empleados como fertilizantes ocasionan a largo plazo problemas en el suelo,

ocasionando que su uso sea cada vez mayor debido a la poca disponibilidad de estos para la planta, generado en algunos casos efectos nocivos. Para disminuir estos efectos, existen alternativas ecológicas como el uso de los microorganismos denominados como biofertilizantes, así como extractos orgánicos y vermicompost (Arancon, Owens, & Converse, 2019; Akinnuoye-Adelabu, Steenhuisen, & Bredenhend, 2019). Estos productos microbianos no llegan a ser tóxicos, sino que son amigables con el medio ambiente, promoviendo el crecimiento de las plantas y el control de las enfermedades.

Así, mediante el empleo de formulaciones microbianas para fertilizar los cultivos, el potencial biológico y la fertilidad del suelo podrían incrementarse, reduciéndose a su vez los efectos nocivos de los agroquímicos (Vessey, 2003; Raklami, Bechtaoui, Tahiri, Anli, Meddich, & Oufdou, 2019), por lo que se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas eficientes (PGPR) (Basu et al., 2021). Para satisfacer su demanda, el rendimiento y la productividad de los cultivos agrícolas también deben de incrementarse (Basu, Prasad, Das, Kalam, Sayyed, Reddy, & El Enshasy, 2021); sin embargo, no hay una única solución para los problemas ecológicos, socioeconómicos y técnicos que existen en la promoción de la agricultura sostenible (Kesavan & Swaminathan, 2018).

Entre los microorganismos con acción PGP más reportados tenemos a bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus*, los cuales promueven el crecimiento vegetal tanto en condiciones normales como en los de estrés biótico y abiótico (Goswami & Suresh, 2020). Por ello se planteó como objetivo de la investigación aislar e identificar bacterias asociadas a géneros conocidos como promotores del crecimiento vegetal asociadas a la especie *Glandularia clavata* que se desarrolla en condiciones áridas.

2. Material y métodos

Material biológico

Se recolectaron muestras de sistema radicular y suelo rizosférico adherido a estas de la especie vegetal nativa *Glandularia clavata* de una zona localizada en las coordenadas geográficas 16°34'26.2"S, 71°25'35.8"W, con una altitud de 2950 msnm, ubicada a las afueras del anexo de Sogay, distrito de Yarabamba, Arequipa, Perú. Del mismo modo, para conocer la taxonomía de dicho material vegetal, se llevó al Departamento

Académico de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSA para su evaluación taxonómica y una porción de suelo rizosférico fue enviada a caracterizar al laboratorio de suelos de la misma universidad. Se tomaron parámetros climáticos de temperatura, humedad y altitud en la zona de muestreo.

Aislamiento de rizobacterias

Se pesó 1 g de las raíces colectadas y se colocaron en un tubo Falcon estéril de 15 mL. Se añadió 10 mL de suero fisiológico NaCl 0,9% con Tritón X-100 al 0,01%, se agitó por 3 minutos y se centrifugó a 1500 RPM por 5 minutos, recuperándose el sobrenadante. Posteriormente, 100 µl de dicho sobrenadante se sembró en medio de cultivo LB agar, para lo cual se dispersó en forma homogénea sobre la superficie del medio utilizando el asa de Digralsky, incubándose a 37 °C por 24 horas.

Se realizó una secuencia de repiques utilizando la técnica de siembra por agotamiento con la finalidad de aislar y purificar las colonias más abundantes de la muestra. Se seleccionó una colonia y se resuspendió en un tubo de microcentrífuga con 1 mL de solución de suero fisiológico NaCl 0,9% con Tritón X-100 al 0,01%; extrayendo 50 µl de la solución después de una agitación vigorosa por 3 minutos, para una nueva siembra por agotamiento usando un asa de Kolle. Se realizaron cinco repiques para garantizar el aislamiento de cepas puras. Este procedimiento se realizó para cada una de las colonias escogidas, morfológicamente diferenciadas mediante observación visual.

Caracterización morfológica

Se realizó tinción Gram, para evaluar en el microscopio características como tamaño, forma, bordes, superficie, consistencia, color de cada una de las cepas aisladas.

Caracterización bioquímica

Se evaluó la actividad bioquímica mediante subcultivo en una serie de medios diferenciales, las que fueron interpretados después de 48 horas de incubación a 37 °C, como: agar Triple Azúcar Hierro (TSH), agar Lisina Hierro (LIA), prueba de citrato, prueba de ureasa, prueba de rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer, movilidad en sulfuro Indol Movilidad (SIM), prueba de fermentación y oxidación (O/F). Además, también se realizó un antibiograma para determinar la susceptibilidad o resistencia a antibióticos, para lo cual se colocó muestra de una cepa de manera homogénea sobre LB agar, posteriormente se colocó discos de seis diferentes antibióticos

distribuidos radialmente en la placa, para posteriormente incubar a 37 °C por 48 horas. La formación de un halo alrededor de los discos de antibióticos fue el indicador de susceptibilidad bacteriana.

Caracterización molecular

Las cepas aisladas fueron enviadas, debidamente etiquetadas, al Laboratorio Funcional Biosciencias, Inc. en Wisconsin, Estados Unidos, en donde se realizó la amplificación de la secuencia de genes ARNr 16S empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Este procedimiento se llevó a cabo extrayendo el ADN mediante el procedimiento previamente descrito (López, 2009; Mendoza & Gutierrez, 2006). Se amplificó el ADNr 16S del ADN genómico extraído de las cepas bacterianas mediante PCR utilizando los primers bacterianos universales 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 1492R (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), para lo cual se utilizó Platinum PCR Supermix High Fidelity en un termociclador Techne Cyclogene (Techne Inc., New Jersey, Estados Unidos). Se purificaron los amplicones de alrededor de 1500 pb utilizando QIAquick PCR Purification Kit. Para la secuenciación, se utilizó Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems que utiliza didesoxinucleótidos fluorescentes (método de terminación de cadena), para después ser analizadas por electroforesis capilar en un secuenciador automático (ABI 3730XL DNA Analyzer) que traduce las señales fluorescentes en la secuencia de bases correspondiente.

Las secuencias obtenidas fueron editadas en MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) y analizadas individualmente. Las secuencias fueron depositadas en el GenBank y se compararon con otras de la misma base de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Las secuencias con las cuales se produjeron alineamientos significativos fueron elegidas para realizar un alineamiento múltiple en el programa MEGA 6.0 con la finalidad de construir un árbol filogenético para cada una de las secuencias de las cepas aisladas y poder conocer su identificación.

3. Resultados y discusión

Material vegetal

La zona de muestreo presentó condiciones edafoclimáticas limitantes para el desarrollo de cultivos (Tabla 1), siendo un ambiente para el estrés hídrico, nutricional y ambiental. La adaptación de las especies presentes en la zona de

muestreo podría deberse a la microbiota presente en el suelo y su interacción con la rizosfera, por lo que los microorganismos que se aislen de dicha rizosfera podrían tener acción PGPR. El material vegetal de donde se aislaron las rizobacterias fue identificada por el Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSA, como *Glandularia clavata* (Ruiz & Pav.), una planta herbácea anual perteneciente a la familia Verbenaceae (Figura 1).

Tabla 1

Características del suelo y clima relacionadas a *Glandularia clavata* (Ruiz & Pavon) Botta

Características del suelo y clima		Valor	
Análisis físico	Textura	Franco limoso	
	Arena (%)	20	
	Limo (%)	70	
	Arcilla (%)	10	
	Materia orgánica (%)	bajo	
	Humedad (%)	70,5	
	Temperatura °C	19,5	
Análisis químico	Nitrógeno nítrico (kg/ha)	traza	
	Fósforo (kg/ha)	traza	
	Potasio (kg/ha)	baja	
	extracto 1:2:5	pH	5,8
		CE	0,01
salinidad	baja		
Clima	Temperatura °C	13,8	
	Humedad (%)	26	
	Altitud msnm	2950	

Esta planta es endémica del suroeste de Perú, de los departamentos de Ica y Arequipa, entre 350 a 3300 m, creciendo sobre suelos arenosos, rocosos o arcillosos. *G. clavata* es una planta postrada sufruticosa, con tallos hispídos. Se caracteriza principalmente porque sus hojas son sésiles, fasciculadas, trisecadas desde la base. Mientras sus inflorescencias están en forma pleiobotrio. La corola es de color blanco a rosado con la superficie externa densamente pubérula (O'Leary & Mulgura, 2014).

Tabla 2

Características morfológicas de cepas aisladas de rizosfera de *Glandularia clavata*

Código	Tamaño	Forma	Borde	Color	Luz transmitida	Consistencia	Reacción Gram
LDVA-01	Grande	Irregular	Lobulado	Blanco	Traslúcida	Cremosa	+
LDVA-02	Mediano	Redondeado	Liso	Blanco	Opaca	Cremosa	-
LDVA-03	Grande	Irregular	Liso	Blanco rosáceo	Opaca	Viscosa	+

Aislamiento de bacterias de rizósfera

Al realizar la siembra de 100 µl del sobrenadante obtenido del tratamiento realizado a las muestras de las raíces recolectadas, se seleccionaron 3 colonias bacterianas; las cuales fueron repicadas hasta 5 veces para asegurar su aislamiento. Dichos aislamientos fueron denominados como: LDVA-01, LDVA-02 y LDVA-03.



Figura 1. A. Planta de *Glandularia clavata*, de donde se aislaron las rizobacterias. B. Vista panorámica de la zona de donde se realizó la colección.

Caracterización morfológica

La morfología celular de las cepas aisladas se determinó por tinción Gram y vista microscópica, identificándose la cepa LDVA-01 como bacilos Gram positivos, la cepa LDVA-02 como diplobacilos Gram negativos y la cepa LDVA-03 como cocobacilos Gram positivos. Otras características se señalan en la Tabla 2.

Caracterización bioquímica

Se realizaron 8 pruebas bioquímicas diferentes para la identificación bacteriana de las cepas aisladas: Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), prueba de citrato, prueba de ureasa, prueba de rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer, Sulfuro Indol Movilidad (SIM) y prueba de fermentación oxidación (O/F). Los resultados de estas pruebas a cada una de las cepas aisladas se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3Caracterización bioquímica de las cepas aisladas de rizósfera de *Glandularia clavata*

Cepa	TSI	LIA	Citrato	Ureasa	RM	VP	Mov	Indol	H ₂ S	Metabolismo
LDVA-01	K/K Gas: (-) H ₂ S: (-)	-	+	+	+	-	-	-	-	Fermentativo
LDVA-02	K/K Gas: (-) H ₂ S: (-)	+	-	+	+	-	-	-	-	No sacarolítico
LDVA-03	K/K Gas: (-) H ₂ S: (-)	+	-	+	+	+	-	-	-	No sacarolítico

Según el análisis bioquímico, los resultados de la prueba TSI indicaron que ninguna de las bacterias aisladas tiene la capacidad de fermentar hidratos de carbono como glucosa o lactosa, no existe producción de gas CO₂ ni de ácido sulfhídrico. Los resultados para la prueba de ureasa indicaron que todas las cepas bacterianas aisladas pueden desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, la cual está vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos (Bailón et al., 2003). Así mismo, la prueba de rojo de metilo dio resultado positivo para todas las cepas bacterianas, lo que indica que existe una producción de ácido en el medio de cultivo producto del metabolismo de glucosa, resultado que difiere del obtenido en la prueba TSI. Los resultados de la prueba SIM dieron negativo para movilidad bacteriana en el medio de cultivo, negativo para producción de indol por desdoblamiento de la molécula triptófano y negativo para liberación de ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre para todas las cepas aisladas. Sin embargo, también hubo diferencia en los resultados de estos análisis entre las cepas evaluadas. De este modo, las cepas bacterianas LDVA-02 y LDVA-03 tienen la capacidad enzimática de descarboxilar el aminoácido lisina para formar una amina, mientras que la cepa LDVA-01 no desarrolló la misma respuesta para la prueba LIA. En la prueba de citrato se observó que sólo la cepa LDVA-01 posee la capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono para su metabolismo y desarrollo. Además, en la prueba de Voges-Proskauer, se confirmó la

producción de acetoína, que es un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa, para la cepa LDVA-03, lo cual no se observó en las otras bacterias aisladas. Finalmente, en la prueba de fermentación/oxidación se determinó que la cepa LDVA-01 posee un metabolismo fermentativo de hidratos de carbono, mientras que las cepas LDVA-02 y LDVA-03 no poseen un metabolismo fermentativo ni oxidativo, es decir, un metabolismo no sacarolítico (Bailón et al., 2003).

Con la finalidad de determinar la susceptibilidad o resistencia de las cepas aisladas a antibióticos se realizó un antibiograma para cada una de las cepas bacterianas aisladas, para lo cual se emplearon seis diferentes antibióticos: Tobramicina, Trimetoprima + sulfametoxazol, Oxitetraciclina, Ampicilina + sulbactam, Vancomicina y Cefalexina, cada uno perteneciente a un grupo de antibióticos diferente. Los resultados se detallan en la Tabla 4. Por otro lado, considerando los resultados del análisis de los antibiogramas y las dimensiones de los halos de inhibición que se formaron alrededor de los discos de antibióticos, se construyó un perfil de resistencia a antibióticos de cada una de las cepas aisladas (Tabla 4). Se observó que la cepa LDVA-01 presenta una moderada resistencia a Cefalexina, siendo susceptible a los demás antibióticos estudiados; la cepa LDVA-02 es susceptible solo a Tobramicina, mostrando resistencia a los demás antibióticos y la cepa LDVA-03 es resistente a Vancomicina, susceptible a Tobramicina y moderadamente resistente a los otros antibióticos empleados en la prueba.

Tabla 4Análisis de antibiograma de cepas aisladas de rizósfera de *Glandularia clavata*

Cepa	TOB	SXT	OT	SAM	VA	CLX
LDVA-01	S	S	S	S	S	S
LDVA-02	S	R	R	R	R	R
LDVA-03	S	S	S	S	R	S

TOB: Tobramicina; SXT: Trimetoprima+sulfametoxazol; OT: Oxitetraciclina; SAM: Ampicilina+sulbactam; VA: Vancomicina; CLX: Cefalexina; S: Susceptible; R: Resistente.

Caracterización molecular

Se amplificaron las secuencias de ADNr 16S de las bacterias aisladas, las que fueron posteriormente secuenciadas y depositadas en el GenBank (KU522000 para el aislado LDVA-01, KU522001 para el aislado LDVA-02 y KU522002 para el aislado LDVA-03). Posteriormente se evaluó la similitud de las secuencias obtenidas con las secuencias depositadas previamente en dicho banco de datos utilizando el algoritmo BLAST. El aislado LDVA-01 presentó un 99,86% de similitud con *Bacillus pumilus* strain FJAT-45161. Este fue llamativo ya que existen reportes de cepas de *B. pumilus* que han demostrado ser eficientes en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico a la vez que retrasa la removilización de nitrógeno en plantas como el maíz (Kuan, Othman, Rahim, & Shamsuddin, 2016) y tomate (Masood, Zhao, & Shen, 2020); así como cepas con producción de ácido indolacético, solubilización de fosfato, acumulación de prolina y producción de exopolisacáridos en condiciones salinas (Kumar, Singh, Mukherjee, Rastogi, & Verma, 2021), teniendo potencial para generar tolerancia a la salinidad a cultivos que estén creciendo en esas condiciones. La cepa LDVA-02 presentó un 100% de similitud con *Pseudomonas fluorescens* strain MCCB 361. Como el caso anterior, la especie *P. fluorescens* induce la defensa de la planta a la que coloniza contra agentes patógenos, ya que tiene acción antagonista contra diferentes fitopatógenos, además de proveer acción promotora del crecimiento vegetal (Hol, Bezemer, & Biere, 2013; David, Chandrasehar, & Selvam, 2018), así como también hay reportes que pueden ayudar a tolerar la toxicidad a metales pesados como el cromo (Singh, Singh, Gupta, Singh, & Keshri, 2019). Finalmente, la cepa LDVA-03 presentó un 99,85% de similitud con *Rhodococcus erythropolis* strain FS49. Esta última especie bacteriana ha sido reportada por jugar un rol importante en la degradación natural y biorremediación de compuestos aromáticos e hidrocarburos sustituidos así como en procesos de desulfurización de combustibles fósiles (Khairy, Wübbeler, & Steinbüchel, 2015), actuando como un biosurfactante que ayudaría a promover esta disponibilidad de los hidrocarburos del petróleo al reducir la tensión entre las dos fases inmiscibles, lo que da como resultado una mayor superficie de la mancha de aceite y una mejor solubilidad de hidrocarburos (Zenati, Chebbi, Badis, Eddouaouda, Boutoumi, El Hattab, ..., & Franzetti, 2018). Todo esto, sin embargo, es necesario confirmarlo mediante ensayos futuros a

nivel de in-vitro, invernadero y en campo; con el fin de cuantificar su acción y compararlo con otros aislamientos de función comprobada.

Microorganismos PGP asociados al género *Glandularia*

Este estudio sería el primer reporte de microorganismos con probable función PGP en especies del género *Glandularia*, en donde la función de los microorganismos aislados se determinó mediante la búsqueda bibliográfica de las especies identificadas. Sin embargo, anteriormente ya se había trabajado con otra especie, *G. pulchella*, ya cual se encontró función fitoremediadora al decolorar los tintes Green HE4B, Remazol Orange 3R y una mezcla simulada en metabolitos no tóxicos (Kabra, Khandare, Kurade, Cavindwar, 2011); siendo esta función incrementada cuando se le inoculó *Pseudomonas montellii*, observándose que ambos organismos actuaron sinérgicamente al exhibir las mejores posibilidades de remoción de color en efluentes de tintes textiles; siendo un método eficiente y más rápido (Kabra, Khandare & Govindwar, 2013).

En otra especie del género, *Glandularia* x híbrida, de cultivar Dulce Coral, se demostró su tolerancia a suelo salino en un experimento en invernadero (Di Filippo, Baldassini, & Vila, 2020). Los autores encontraron que el mecanismo de exclusión Na^+ y Cl^- , así como el mantener una mayor relación K^+/Na^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ en sus hojas, una menor relación raíz: brote y el mantenimiento de la fotosíntesis (Di Filippo, Baldassini, & Vila, 2020). Sin embargo, no se podría descartar que exista acción de rizobacterias que puedan incrementar la acción de esta planta a la tolerancia a sal en ambientes inhóspitos.

4. Conclusiones

Se aislaron 3 cepas bacterianas de una muestra vegetal identificada taxonómicamente como *Glandularia clavata* (Ruiz & Pavon) Botta, que es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Verbenaceae. A dichas cepas aisladas, se les caracterizó morfológica, bioquímica y molecularmente; observándose en la cepa LDVA-01 bacilos Gram positivos, en la cepa LDVA-02 diplobacilos Gram negativos y en la cepa LDVA-03 cocobacilos Gram positivos. Las diferentes pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas permitieron dilucidar la actividad metabólica de cada una de ellas. Así mismo, los antibiogramas que se llevaron a cabo dieron como resultado diferentes perfiles de resistencia a seis

diferentes antibióticos. La amplificación de la secuencia de genes ARNr 16S permitió la identificación de las cepas aisladas LDVA-01, LDVA-02 y LDVA-03 como pertenecientes a las especies *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Rhodococcus erythropolis*, respectivamente; especies que poseen características de PGPR y que podrían ser utilizadas como potenciales biofertilizantes y biorremediadores de suelos contaminados.

Para continuar con una mejor caracterización de las bacterias aisladas, se recomienda realizar ensayos cualitativos y cuantitativos de la producción de ácido indol acético, solubilización de fósforo y fijación de nitrógeno atmosférico de las cepas aisladas, y así tener una idea más clara como biofertilizante. Del mismo modo, sería oportuno aislar e identificar rizobacterias de otras especies vegetales nativas de la región que se desarrollen en zonas edafoclimáticas limitantes para el desarrollo de cultivos.

Referencias bibliográficas

- Akinuoye-Adelabu, D. B., Steenhuisen, S., & Bredenhand, E. (2019) Improving pea quality with vermicompost tea and aqueous biochar: Prospects for sustainable farming in Southern Africa. *S. Afr. J. Bot.*, 123, 278–285.
- Arancon, N. Q., Owens, J. D., & Converse, C. (2019) The effects of vermicompost tea on the growth and yield of lettuce and tomato in a non-circulating hydroponics system. *J. Plant Nutr.*, 42, 2447–2458.
- Bailón, L., González, R., & Cervantes, A. (2003). Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. (U. N. A. de México, Ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13(3), 1140.
- Christensen, J. H., Hewitson, B., Busuico, A., Chen, A., Gao, X., Held, I., Jones, R., Kolli, R. K., Kwon, W. T., & Laprise, R. (2007) Regional climate projections. En: Solomon, S., et al. (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, pp. 848–940.
- David, B. V., Chandrasehar, G., & Selvam, P. N. (2018). *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops. En *Crop improvement through microbial biotechnology*. Elsevier. pp. 221–243.
- Di Filippo, M. L., Baldassini, P., & Vila, H. F. (2020). Morphological and physiological traits reveal differential salinity tolerance of two contrasting *Glandularia* cultivars. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 32(3), 231–241.
- Goswami, M., & Suresh, D. E. K. A. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria—alleviators of abiotic stresses in soil: a review. *Pedosphere*, 30(1), 40–61.
- Hol, W. H. G., Bezemer, T. M., & Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Frontiers in Plant Science*, 4(April), 81.
- Imhof, L., Suárez, M. A., Hick, E. C., Cáceres, N., Matoff, E. E., & Galetto, L. (2018). Selection of ornamental glandularia hybrids potentially used as pot or bedding plants. *European Journal of Horticultural Science*, 83(3), 135–141.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). (2007) Mapa de Isoyetas. Lima.
- Kabra, A., Khandare, R., Kurade, M., & Govindwar, S. (2011) Phytoremediation of a sulfonated azo dye Green HE4B by *Glandularia pulchella* (Sweet) Tronc. (Moss Verbena). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1360–1373.
- Kabra, A. N., Khandare, R. V., & Govindwar, S. P. (2013) Development of a bioreactor for remediation of textile effluent and dye mixture: a plant bacterial synergistic strategy. *Water Res.*, 47, 1035–1048.
- Kesavan, P. C., & Swaminathan, M. S. (2018) Modern technologies for sustainable food and nutrition security. *Curr. Sci.*, 115, 1876–1883.
- Khairy, H., Wübbeler, J. H., & Steinbüchel, A. (2015). Biodegradation of the Organic Disulfide 4, 4' - Dithiodibutyric Acid by *Rhodococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24), 8294–8306.
- Khandare, R. V., & Govindwar, S. P. (2015). Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1697–1714.
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, 11(3), 1–19.
- Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Srivastava, R. (2019). Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 20, 101271.
- Kumar, A., Singh, S., Mukherjee, A., Rastogi, R. P., & Verma, J. P. (2021). Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPV511 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress. *Microbiological Research*, 242, 126616.
- López, N. (2009). Aislamiento, identificación y actividad biocida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* a partir de suelos agrícolas de diferentes áreas de la provincia de Arequipa, 2008. Universidad Católica Santa María.
- Masood, S., Zhao, X. Q., & Shen, R. F. (2020). *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. *Scientia Horticulturae*, 272, 109581.
- Mendoza, L., & Gutierrez, A. (2006). Identificación de bacterias hipolíticas de suelos desérticos de La Joya – Arequipa, mediante amplificación del ADN ribosomal 16S. Universidad Católica Santa María.
- O'Leary, N., & Mulgura, M. E. (2014). Synopsis of tribe Verbeneae Dumortier (Verbenaceae) in Peru. *Phytotaxa*, 163(3), 121–148.
- Raklami, A., Bechtaoui, N., Tahiri, A., Anli, M., Meddich, A., & Oufdou, K. (2019) Use of rhizobacteria and mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility. *Front. Microbiol.*, 10, 1106.
- Rocha Miranda, A. J. (2015). Análisis de los factores que limitan la mejora económica de los productores rurales organizados en el distrito de Yarabamba, Provincia de Arequipa, Perú, 2015 (Doctoral dissertation, Universidad EAFIT).
- Singh, S. K., Singh, P. P., Gupta, A., Singh, A. K., & Keshri, J. (2019). Tolerance of heavy metal toxicity using PGPR strains of *Pseudomonas* species. En *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*. Woodhead Publishing. pp. 239–252.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipi, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Vessey, J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255, 571–586.
- Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M., & Franzetti, A. (2018) A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotox Environ Safe*, 154, 100–107.