

Optimización de medios de cultivos con fuentes agroindustriales para el crecimiento del ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir)

Luna Castellanos, L.L.¹ & Sánchez López, D.B.^{2*}

RESUMEN

Los inoculantes microbianos constituyen una alternativa para contrarrestar los impactos ambientales adversos que ejercen los agroquímicos sintéticos, facilitan el crecimiento vegetal y el rendimiento de los cultivos de manera ecológica. Por tanto, es indispensable producir inoculantes de buena calidad y de bajo costo, con fuentes nutricionales amigables con el medio ambiente y favorables para el crecimiento microbiano y vegetal. En este sentido, se realizó la evaluación a nivel *in vitro* de nueve medios de cultivo a partir de fuentes nutricionales agroindustriales para la multiplicación de las rizobacterias DSC1 (*Bacillus licheniformis*), DSC21 (*Brevibacillus laterosporus*) y DCR11 (*Azotobacter vinelandii*) y su capacidad para producir citoquininas. Los resultados permitieron seleccionar tres medios de cultivo (medio B, C y D) óptimos para la multiplicación de las rizobacterias y producción de la fitohormona. Los medios de cultivo seleccionados para cada una de las rizobacterias fueron inoculados bajo diferentes dosis (0 mL, 2 mL, 4 mL, y 6 mL) en esquejes apicales de ñame espino bajo condiciones de casa de malla. La aplicación DSC1 *B. licheniformis* con 2 mL⁻¹ estimuló en 31.67% la acumulación de biomasa fresca en las raíces y un 22.22% del peso seco aéreo. La producción de biomasa fresca aérea fue incrementada en un 33.22% por DCR11 *A. vinelandii* en dosis de 6 mL⁻¹, bajo esta misma dosis esta rizobacteria incremento en 7.36% la producción de pigmentos fotosintéticos. La inoculación de plantas de ñame espino con medios de cultivo de fuentes agroindustriales generan efectos beneficiosos en el crecimiento de la planta.

Palabras clave: Carbohidrato, nitrógeno, clorofila, siembra, reguladores de crecimiento.

1.- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia, Centro de Investigación Turipaná, Km 13 Vía Montería-Cereté, Colombia. ORCID Luna Castellanos, L.L.: 0000-0003-2172-7842; ORCID Sánchez López, D.B.: 0000-0001-9715-4097.

*Email: dbsanchez@agrosavia.co

Manuscrito recibido el 16 de junio de 2021 y aceptado para su publicación el 22 de octubre de 2021.

ABSTRACT

Optimization of culture media with agroindustrial sources for the growth of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir).

Microbial inoculants are a suitable alternative for counteracting the adverse environmental effects of synthetic agrochemicals due to their capacity for promoting plant growth and increasing crop yield in an ecologically sustainable manner. To benefit from these advantages, microbial inoculants production must offer products of high quality and low cost using environmentally sustainable sources that provide rich nutrients for microbial and plant growth. In this study, we assess the production of cytokinins by the rhizobacteria strains DSC1 (*Bacillus licheniformis*), DSC21 (*Brevibacillus laterosporus*) and DCR11 (*Azotobacter vinelandii*) in nine culture media that contains agro-industrial residues. We identified three culture media (medium B, C and D) that promote rhizobacteria growth and phytohormone production. The fermented rhizobacteria products were inoculated at different doses (0 mL, 2 mL, 4 mL, and 6 mL) in white yam apical cuttings under net house conditions. 2 mL⁻¹ of DSC1 *B. licheniformis* increased fresh storage root biomass by 31.67% and 22.22% of the aerial dry weight. Fresh aerial biomass was increased by 33.22% by DCR11 *A. vinelandii* in doses of 6 mL⁻¹, increasing the production of photosynthetic pigments by 7.36%. We demonstrated that inoculation of white yam plants with fermented products from agroindustrial residues has the potential to increase plant growth.

Key words: fig, guarinta, ostiolo, fungi, postharvest.

INTRODUCCIÓN

Dada la tasa actual de crecimiento de la población humana, los sistemas agroalimentarios deben satisfacer las altas demandas y generar bajos efectos ambientales para promover una agricultura sostenible (Kalyanasundaram *et al.*, 2021). En la actualidad, el 50% de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas se suministra principalmente a partir de fertilizantes químicos, sin embargo, el uso indiscriminado de estas fuentes nutritivas genera disminución de la biodiversidad, contaminación ambiental, desbalance de nutrientes y materia orgánica, y pérdidas económicas a los agricultores (Poveda *et al.*, 2021).

En este sentido, el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPRs,

siglas en inglés), constituyen un recurso bacteriano importante para el sostenimiento de la agricultura, debido a que promueven el crecimiento de las plantas y aumentan el rendimiento de los cultivos a un bajo costo (Li *et al.*, 2020). En la producción de inóculos bacterianos a gran escala con fines comerciales se deben considerar materias primas que garanticen la supervivencia de los microorganismos, desde la producción hasta la aplicación, siendo económico, estéril, no reactivo, fácilmente disponible y compatible con el medio ambiente (Bharti *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2020).

La selección de sustratos, formulación adecuada, método y medio de propagación del inóculo (medio y sistema de cultivo), puede ser una limitante en el proceso de producción de un biofertilizante, además

del alto costo de las materias primas industriales (Chaudhary y Shukla 2020). Igualmente, se deben optimizar los parámetros de fermentación de los inóculos bacterianos para garantizar un adecuado crecimiento de las bacterias (Lotfy, 2007). De acuerdo con Hazra *et al.* (2010) la selección de sustratos y materias primas rentables puede reducir los costos de producción hasta un 50%, este paso constituye un obstáculo para la producción masiva de productos a base de microorganismos. En este sentido, los subproductos agrícolas son una alternativa viable para incrementar la biomasa microbiana en procesos de producción y fermentación, como medios de cultivo y sustratos. A pesar de las marcadas ventajas que representan los subproductos agrícolas como posibles medios de cultivo, estos deben crearse en función de los requerimientos del microorganismo, con una fuente de carbono, nitrógeno, macro y micronutrientes estable (Cobo, 2017).

En este sentido, se realizó una investigación con el fin de optimizar la producción de medios de cultivos con fuentes agroindustriales para la multiplicación de tres rizobacterias y evaluar el efecto de la aplicación sobre el crecimiento de plántulas de ñame espino (*D. rotundata* Poir).

METODOLOGÍA

Localización

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- Agrosavia, Centro de Investigación Turipaná, localizado a 8°50'79" N y 75°47'58" W en el municipio de Cereté departamento de Córdoba en Colombia a una altura de 13 msnm. La zona presenta características

acordes a un bosque seco tropical (Bs-T), con una temperatura media anual de 27 °C y una precipitación media de 1.500 mm (Contreras *et al.*, 2020). La investigación se desarrolló en dos etapas: En la etapa I consistió en la optimización de un medio de cultivo para la multiplicación de tres rizobacterias con fuentes agroindustriales bajo condiciones controladas en la Unidad de Laboratorio de Turipaná- Agrosavia en el área de Microbiología Agrícola. En la etapa II se evaluó el efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el crecimiento de esquejes apicales de ñame espino en condiciones de casa de malla.

Rizobacterias

Las rizobacterias empleadas en este estudio DSC1 (*Bacillus licheniformis*), DSC21 (*Brevibacillus laterosporus*) y DCR11 (*Azotobacter vinelandii*) fueron seleccionadas del banco de trabajo del Centro de Investigación Turipaná-Agrosavia, debido a que se destacaron como PGPRs promisorias dadas sus características como la producción de hormonas vegetales y solubilización de fósforo a nivel *in vitro* (Sánchez-López y Pérez-Pazos, 2018).

Etapas I: Optimización de medio de cultivo para rizobacterias

Para la optimización del medio de cultivo fueron seleccionadas como materias primas, una fuente de carbono: Sacarosa (Azúcar común, marca Manuelita®), dos fuentes de nitrógeno: levadura seca (marca Levapan®) y harina de frijol (marca Aburrá®) y dos microelementos: sulfato de magnesio (marca Nutrimon®) y cloruro de sodio (marca Refisal®). Para determinar el efecto de las fuentes agroindustriales en el multiplicación de las rizobacterias se utilizaron diseños estadísticos secuenciales. En

primera instancia, se utilizó una matriz de diseño Plackett y Burman (1946) para la identificación de las fuentes con efectos positivos, donde se realizaron combinaciones entre las fuentes agroindustriales. Las dosis de la levadura y sacarosa se evaluaron con tres niveles (alto, intermedio y bajo), mientras que las dosis de las fuentes harina de frijol y sulfato de magnesio cloruro de sodio se mantuvieron fijas. Se realizaron un total de nueve (9) combinaciones, las cuales se detallan en la Tabla 1. En segunda instancia, se aplicó un diseño factorial para optimizar las fuentes seleccionadas empleando un análisis de superficie de respuesta “Box-Behnken” (Box Behnken 1960).

Para llevar a cabo la optimización del medio de cultivo, las tres rizobacterias fueron reactivadas en medio de cultivo nutritivo (marca Merck®), posteriormente, las células bacterianas fueron cultivadas para obtener un pre- inóculo. A partir de este pre-inóculo, se realizó la inoculación de las rizobacterias en los nueve medios líquido de cultivo con fuentes agroindustriales por

triplicado, empleando un volumen final de 150 mL en relación 1/2 y un pre-inóculo del 10%. Los inóculos fueron colocados en agitación a 150 rpm y $30\pm 2^\circ\text{C}$ en un agitador orbital (Genesys™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific®, USA).

Se tomaron muestras del cultivo bacteriano líquido cada tres horas durante un periodo de 36 h, las cuales fueron sembradas en medios de cultivos sólidos agroindustriales a partir de la técnica de la microgota (Romeiro, 2007) para el conteo de microorganismos. Los medios de cultivos agroindustriales sólidos se elaboraron con la formulación detallada en la Tabla 1, y se adicionaron 18 g L^{-1} de agar-agar para la solidificación. Como variable respuesta de este experimento se determinó el crecimiento celular (biomasa en UFC) y el costo del medio de cultivo optimizado.

Detección de citoquininas en rizobacterias multiplicadas en medios de cultivo con fuentes agroindustriales

Las rizobacterias fueron sembradas en los medios de cultivo líquidos seleccio-

Tabla 1: Descripción de fuentes y dosis utilizadas en la elaboración de los medios de cultivo agroindustriales.

Table 1: Description of sources and doses used in the elaboration of agroindustry culture media

Medio de Cultivo Agroindustrial	Ingredientes (g L^{-1})				
	Azúcar común	Levadura seca	Harina de frijol	Sulfato de magnesio	Cloruro de sodio
Medio cultivo A	15.00	0.30	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo B	17.50	0.30	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo C	20.00	0.30	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo D	15.00	0.40	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo E	17.00	0.40	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo F	20.00	0.40	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo G	15.00	0.50	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo H	17.00	0.50	0.50	0.20	0.50
Medio cultivo I	20.00	0.50	0.50	0.20	0.50

nados en la etapa I y colocadas en agitación durante cinco días a 150 rpm y 30 °C. Posteriormente, se obtuvo un filtrado libre de células centrifugando 20 mL de cultivo a 16000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Thermo, IEC HN-SII, USA). El sobrenadante obtenido se neutralizó con NaOH 7 N (pH 7.0) y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa (Millipore; tamaño de poro 22 µm), luego se extrajo tres veces con n-butanol saturado con agua destilada (1:1). Durante la fase acuosa y orgánica los compuestos se sometieron a evaporación y secado, seguidamente fueron reconstituidos con metanol. Las fracciones de metanol reunidas (extracto bacteriano) se cromatografiaron en gel de sílice Merck 60 PF254 con citoquininas estándares Trans-Zeatina (Sigma aldrich®) y Trans-Zeatin Riboside (Sigma aldrich®) usando n-butanol: ácido acético: agua (12:3:5) (v/v) como fase móvil. Los cromatogramas se observaron bajo luz UV de 245 nm para detectar las citoquininas como describen El-Tarabily *et al.* (2003). Los valores de movilidad cromatográfica (Rf) se calcularon tanto para los estándares como para las muestras, siguiendo la ecuación:

$$R = \frac{\text{Distancia recorrida por el solvente}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

La extracción, fraccionamiento y cuantificación de citoquininas se realizó por cromatografía de capa fina. Se empleó como control positivo de las rizobacterias la cepa *Bacillus subtilis* ATCC® 19659.

Etapa II. Efecto de la inoculación de rizobacteria en el crecimiento plantas de ñame.

Material vegetal. Bajo condiciones controladas de casa de malla fueron sembrados los esquejes apicales de ñame espinoso procedentes del material genético 0307-49SB del banco de germoplasma de ñame- Agro-savia. Estos esquejes fueron sembrados en contenedores plásticos con capacidad para 24 alveolos en un sustrato que contenía aluvión, arena y materia orgánica en proporción 3:2:1. El sustrato fue desinfectado de forma química empleando la molécula fúngica 1.4- Difórmil Propano en dosis de 5.0 mL L⁻¹. Las características fisicoquímicas del sustrato correspondieron a textura arenosa franco, pH 6.61, conductividad eléctrica 0.22 dS.m⁻¹, Capacidad Interc Catiónica 6.48 cmol (+). k⁻¹, materia orgánica 0.49 g.100 g⁻¹, fósforo disponible 4.05 mg.kg⁻¹, potasio <0.09 cmol (+).kg⁻¹.

Inoculación de rizobacterias y manejo del experimento. Los esquejes de ñame fueron inoculados con las rizobacterias DSC1 *B. licheniformis*, DSC21 *B. laterosporus* y DCR11 *A. vinelandii*, las cuales fueron sembradas en medios líquidos con fuentes agroindustriales seleccionados en la etapa I de esta investigación. Los caldos de cultivo inoculados con las rizobacterias fueron sometidos a una agitación de 150 rpm (Labnet Orbit™ 1900, USA) durante el tiempo de crecimiento estandarizado para obtener una población bacteriana correspondiente a 10⁸ UFC mL⁻¹.

La inoculación de las rizobacterias se realizó de forma conjunta con la aplicación de la fertilización química, la cual se ejecutó de forma fraccionada: 20% a los 45 días después de la siembra (DDS), 30% a

los 95 DDS y el 50% restante se aplicó a los 130 DDS. Se empleó el fertilizante comercial Triple 15® en dosis total de 10 g planta⁻¹. La dosis del fertilizante fue calculada teniendo en cuenta los requerimientos del cultivo y el análisis de las propiedades químicas del sustrato. Los esquejes fueron mantenidos bajo condiciones controladas de casa de malla, se usó una polisombra negra del 65%, la cual permitió una entrada de luz de 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con 29 °C en promedio y humedad relativa del 77%. Los esquejes fueron regados de forma manual con una frecuencia diaria. El manejo agronómico de los esquejes consistió en el control manual de malezas y monitoreo de insectos. Se realizaron aplicaciones de forma preventiva de los fungicidas Amistar top® (2.0 mL L⁻¹), Oxithane® (2.0 g L⁻¹) y Ridomil Gold® 68 WG (2.0 g L⁻¹) con una frecuencia quincenal.

Diseño experimental y variables de respuesta. Para determinar la respuesta de esquejes de ñame espinoso a la inoculación de rizobacterias multiplicadas en medios de cultivos con fuentes agroindustriales, se estableció un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial y tres repeticiones. Los factores evaluados correspondieron a las rizobacterias (DSC1 *B. licheniformis*, DSC21 *B. laterosporus* y DCR11 *A. vinelandii*) y a diferentes dosis de inóculo (0 mL, 2 mL, 4 mL, y 6 mL). Se evaluaron 12 tratamientos en total y se emplearon 36 unidades experimentales (UE). Cada unidad experimental estuvo constituida por 24 esquejes apicales. Como variables respuesta se determinó a los 180 DDS el peso fresco de la parte aérea (*PFRESA*) de la planta (hojas + tallo) y de la parte radicular (*PFRESR*) de tres plantas de cada UE. Asimismo, fue registrado con una balanza analítica (OHAUS CORPORATION,

V11P6, USA), el peso seco de la parte aérea (*PFRESR*) y radicular (*PSECR*) estos órganos después de transcurridos 48 h de secado en estufa a una temperatura de 70°C \pm 2°C. Además, se determinó el contenido de clorofilas (unidades SPAD) utilizando un medidor portátil de concentración de clorofilas referencia SPAD-502 MC-100, Konica Minolta, Tokio.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), después de comprobados los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene respectivamente. Los análisis estadísticos de la etapa I y II de esta investigación fueron realizados con el Software estadístico Statgraphics Centurion XVI.II v16.2.04 (español).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del medio de cultivo con fuentes agroindustriales

A partir de una matriz de diseño Plackett y Burman se logró determinar que las fuentes nutricionales con efecto positivo ($p \leq 0.05$) sobre la producción de biomasa para las rizobacterias DSC1 *B. licheniformis* y DSC21 *B. laterosporus* correspondieron a levadura, sacarosa 2 (20 g L⁻¹) y la adición del microelemento 2 (cloruro de sodio 0.5 g) (Figura 1A y 1B). Por su parte, la rizobacteria DCR11 *A. vinelandii* solo mostró efecto significativo en la producción de biomasa con la utilización de levadura y sacarosa 2 (20 g L⁻¹) (Figura 1C). A partir de los resultados obtenidos (Figura 1A, 1B y 1C) se puede inferir que la harina de frijol como fuente de nitrógeno genera

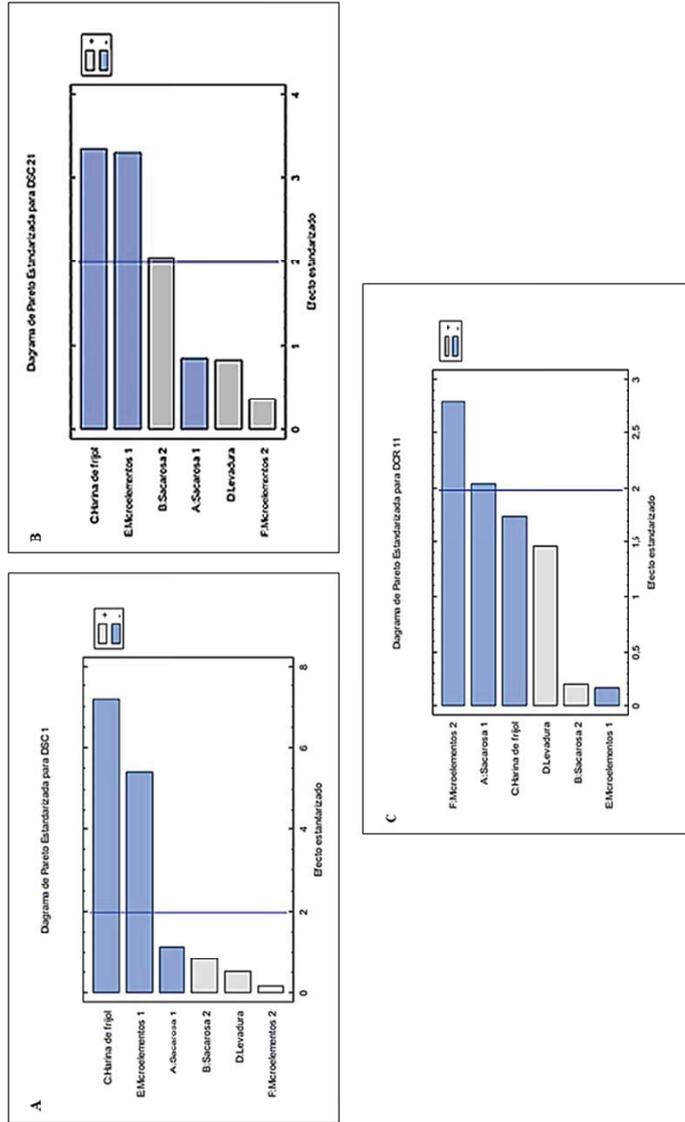


Figura 1: Diagrama de Pareto del efecto de las fuentes de carbono, nitrógeno y microelementos en la optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa de: A) DSC1 B. licheniformis, B) DSC21 B. laterosporus, y C) DCR11 A. vinelandii. Sacarosa 1 (15 g L⁻¹), sacarosa 2 (20 g L⁻¹), microelemento 1 (sulfato de magnesio 0,5 g), microelemento 2 (cloruro de sodio 0,5 g).

Figure 1: Pareto diagram of the effect of carbon, nitrogen and microelements sources in the optimization of the culture medium for the biomass production of: A) DSC1 B. licheniformis, B) DSC21 B. laterosporus, and C) DCR11 A. vinelandii. Sucrose 1 (15 g L⁻¹), sucrose 2 (20 g L⁻¹), microelement 1 (magnesium sulfate 0.5 g), microelement 2 (sodium chloride 0.5 g).

un efecto negativo o no significativo sobre el crecimiento de las tres rizobacterias, por lo tanto, no se debe utilizar para la producción de los inóculos de estas rizobacterias.

Con base en los parámetros estimados del diseño Box-Behnken, se logró identificar la combinación óptima de levadura y sacarosa que permiten incrementar, así como predecir el comportamiento de la producción de biomasa para cada una de las rizobacterias en estudio. A partir de este diseño factorial se obtuvieron las ecuaciones que aparecen detalladas en la Tabla 2.

A partir de los parámetros estimados se logró establecer cuáles son los niveles óptimos que se deben emplear de cada fuente en la preparación de medios de cultivo agroindustriales para cada rizobacteria. En la Figura 2A, se puede evidenciar que DSC1 *B. licheniformis* puede mostrar tendencias positivas en la producción de biomasa al emplear niveles altos de levadura y sacarosa, aunque estos no difieran significativamente de los niveles bajos ($p \geq 0.05$), por lo cual, se deben seleccionar niveles intermedios para evitar desperdicios en la dosificación de las

fuentes, por lo cual, se sugeriría emplear el medio de cultivo B para optimizar el crecimiento de esta rizobacteria.

Entre tanto, la DSC21 *B. laterosporus* mostró una producción de biomasa favorable en medios de cultivo con 15.00 g L⁻¹ de sacarosa y 0.40 g L⁻¹ de levadura (Figura 2B), por lo cual, el medio de cultivo D, puede ser ideal para satisfacer este requerimiento nutricional de la bacteria.

Con relación a DCR11 *A. vinelandii*, los niveles altos de sacarosa (20.00 g L⁻¹) y bajos de levadura (0.30 g L⁻¹) utilizados en el medio de cultivo C generan efecto positivo ($p \leq 0.05$) en el crecimiento de esta rizobacteria (Figura 2C).

Producción de biomasa de las rizobacterias en los medios de cultivo optimizados

En la Figura 3, se puede observar la producción de biomasa (LOG10 UFC mL⁻¹) obtenida por cada una de las rizobacterias en los medios de cultivo optimizados. Los resultados evidenciaron que DSC1 *B. licheniformis* en el medio de cultivo B alcanzó su valor más alto de biomasa (10.86 Log10

Tabla 2: Combinación óptima de levadura y sacarosa para predecir el comportamiento de rizobacterias.

Table 2: Optimal combination of yeast and sucrose to predict the behavior of rhizobacteria.

Rizobacterias	Ecuación de regresión ajustada
DSC1 <i>B. licheniformis</i>	$y = 6.804 + 0.1317 * \text{Sacarosa}^2 - 0.06117 * \text{Levadura} + 0.1372 * \text{Sacarosa} * \text{Levadura} + 0.03816 * \text{Sacarosa} * \text{Levadura} + 0.6666 * \text{Levadura}$. Siendo Y: biomasa viable (UFC mL ⁻¹).
DSC21 <i>B. laterosporus</i>	$y = 7.925 - 1.881 * \text{Sacarosa} - 0.3533 * \text{Levadura} + 0.8574 * \text{Sacarosa}^2 + 1.257 * \text{Sacarosa} * \text{Levadura} - 1.72 * \text{Levadura}$.
DCR11 <i>A. vinelandii</i>	$y = 7.925 - 1.881 * \text{Sacarosa} - 0.3533 * \text{Levadura} + 0.8574 * \text{Sacarosa}^2 + 1.257 * \text{Sacarosa} * \text{Levadura} - 1.72 * \text{Levadura}$.

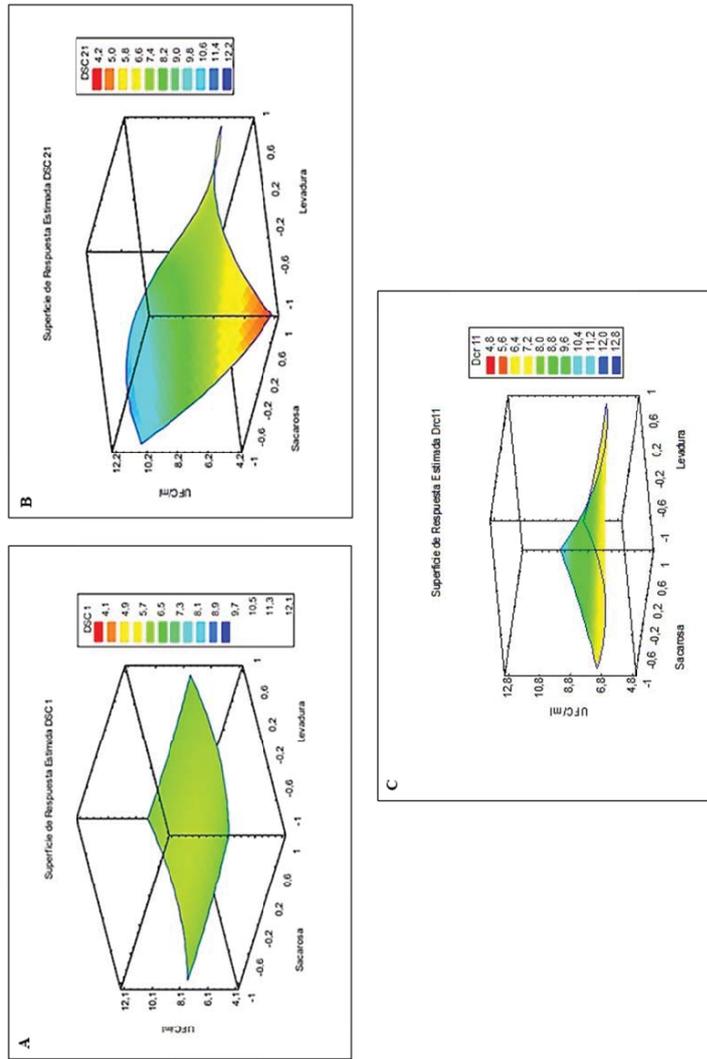


Figura 2: Superficie de respuesta y niveles óptimos de las fuentes estimadas para: A) DSC1 *B. licheniformis*, B) DSC21 *B. laterosporus*, y C) DCR11 *A. vinelandii*.
 Figure 2: Response surface and optimal source levels estimated for: A) DSC1 *B. licheniformis*, B) DSC21 *B. laterosporus*, and C) DCR11 *A. vinelandii*.

UFC mL⁻¹) transcurridas 12 h (Figura 3). Por su parte, la rizobacteria DSC21 *B. late-rosporus* en el medio de cultivo D, produjo la mayor cantidad de biomasa (10.79 Log₁₀ UFC mL⁻¹) transcurridas 9 h de cultivo.

La DCR11 *A. vinelandii* alcanzó el máximo valor de producción de biomasa (10.36 Log₁₀ UFC mL⁻¹) transcurridas 18 h de cultivo (Figura 3) en el medio de cultivo C. Teniendo en cuenta la producción de biomasa detalla en la Figura 3 para cada una de las rizobacterias, se puede afirmar que para la producción de inóculos de la rizobacteria DSC1 se debe dejar en agitación 12 h, para DSC21 9 h y para DCR11 la agitación debe permanecer por 18 h, con este tiempo se obtendrá la cantidad de células viables requeridas para realizar la inoculación.

La DCR11 *A. vinelandii* alcanzó el máximo valor de producción de biomasa

(10.36 Log₁₀ UFC mL⁻¹) transcurridas 18 h de cultivo (Figura 3) en el medio de cultivo C. La fase estacionaria se mantuvo desde las 21 h hasta 30 h.

Teniendo en cuenta la cinética de crecimiento observada en la Figura 3 para cada una de las rizobacterias, se puede afirmar que para la producción de inóculos de la rizobacteria DSC1 se debe dejar en agitación 12 h, para DSC21 9 h y para DCR11 la agitación debe permanecer por 18 h, con este tiempo se obtendrá la cantidad de células viables requeridas para realizar la inoculación.

Producción de citoquininas por rizobacterias en medios con fuentes agroindustriales

La multiplicación de las rizobacterias DSC1 en medio de cultivo B, DSC21 en medio de cultivo D y DCR11 en medio de cultivo C, permite que estas rizobacterias

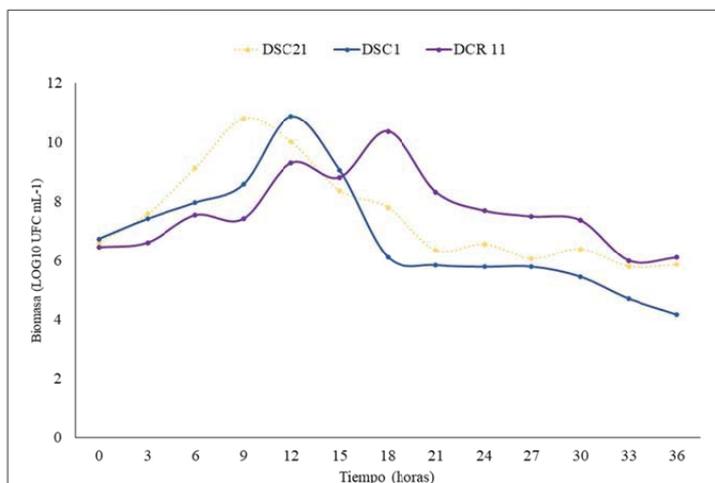


Figura 3: Producción de biomasa de las rizobacterias en los medios de cultivo optimizados.

Figure 3: Biomass production of rhizobacteria in optimized culture media.

puedan llevar a cabo la producción de la hormona citoquinina, lo cual fue evidenciado de forma cualitativa en la placa de cromatografía a través de la formación de manchas rosadas fluorescentes (Figura 4A). La cepa DCR11 *A. vinelandii* demostró su alta capacidad de producir estos compuestos (Figura 4B), al obtener el mayor valor en el rango de movilidad cromatográfica (0.31). Por tanto, las fuentes y las dosis seleccionadas para preparar los medios de cultivo y producir los inóculos de las rizobacterias son adecuadas para favorecer el crecimiento.

Las citoquininas son moléculas de señalización importantes para regular el crecimiento y el desarrollo de la planta a lo largo de su ciclo fenológico, intervienen en los procesos de embriogénesis y mantenimiento de la raíz, producción de meristemos apicales y desarrollo vascular de la raíz. También modulan el alargamiento de las raíces, el número de raíces laterales, la formación de nódulos y la dominancia apical en respuesta a los estímulos ambientales (Osugi y Sakakibar, 2015).

Costos medio de cultivo agroindustrial optimizado

De forma rutinaria en los laboratorios de Microbiología Agrícola se emplea medio de cultivo nutritivo (marca Merck®) para la multiplicación de bacterias, lo que representa una inversión de 6.99 USD por cada litro preparado. Los resultados del análisis de costos (Tabla 3), se realizaron con base en los precios de referencia de los insumos en el mercado. Con base en esto resultados, se puede afirmar que la utilización de los medios de cultivo con fuentes agroindustriales optimizados reduce los costos de preparación de los medios de cultivos de 6.99 USD a 0.021378 USD para DSC1 *B. licheniformis*, 6.99 USD a 0.02107 USD para DSC21 *B. laterosporus* y de 6.99 USD a 0.02422 USD para DCR11 *A. vinelandii* respectivamente. La utilización de fuentes agroindustriales para la producción de inóculos bacterianos constituye una alternativa viable no solo a nivel biológico sino también en el aspecto económico.

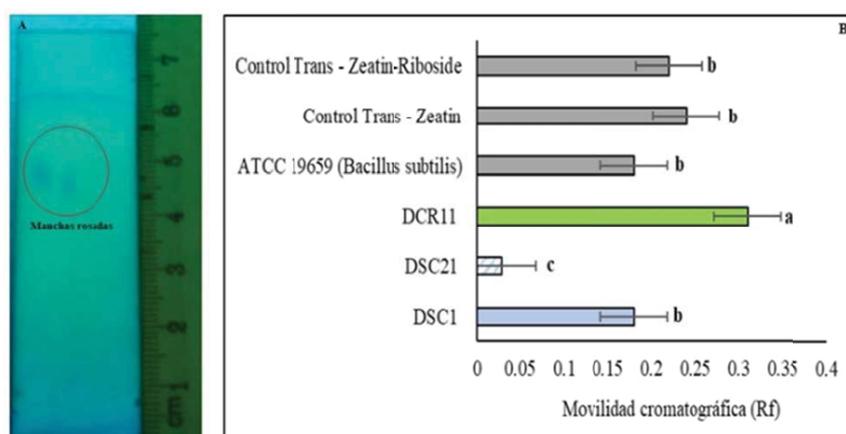


Figura 4: A. Determinación cualitativa de citoquininas. B. Rango de movilidad cromatográfica.
Figure 4: A. Qualitative determination of cytokinins. B. Chromatographic mobility range.

Tabla 3: Costos medio de cultivo optimizado para las rizobacterias DSC1, DSC21 y DCR11.
 Table 3: Optimized culture medium costs for rhizobacteria DSC1, DSC21 and DCR11.

Medio B: DSC1 <i>B. licheniformis</i>				
Componentes	PPT (g)	PC	Cant. (g L ⁻¹)	Total
Azúcar común (marca Manuelita®)	500	0.45 USD	17.5	0.01575 USD
Levadura seca (marca Levapan®)	80	1.01 USD	0.3	0.00378 USD
Harina de frijol (marca Aburrá®)	500	1.12 USD	0.5	0.00112 USD
Sulfato de magnesio (marca Nutrimon®)	1000	2.64 USD	0.2	0.000528 USD
Cloruro de sodio (marca Refisal®)	500	0.20 USD	0.5	0.0002 USD
			Total (g L ⁻¹)	0.021378 USD
Medio C: DCR11 <i>A. vinelandii</i>				
Componentes	PPT (g)	PC	Cant. (g L ⁻¹)	Total
Azúcar común (marca Manuelita®)	500	0.45 USD	20	0.0180 USD
Levadura seca (marca Levapan®)	80	1.01 USD	0.3	0.00370 USD
Harina de frijol (marca Aburrá®)	500	1.12 USD	0.5	0.00112 USD
Sulfato de magnesio (marca Nutrimon®)	1000	2.64 USD	0.5	0.00132 USD
Cloruro de sodio (marca Refisal®)	500	0.20 USD	0.2	0.00008 USD
			Total (g L ⁻¹)	0.02422 USD
Medio D: DSC21 <i>B. laterosporus</i>				
Componentes	PPT (g)	PC	Cant. (g L ⁻¹)	Total
Azúcar común (marca Manuelita®)	500	0.45 USD	15	0.0135 USD
Levadura seca (marca Levapan®)	80	1.01 USD	0.4	0.00505 USD
Harina de frijol (marca Aburrá®)	500	1.12 USD	0.5	0.00112 USD
Sulfato de magnesio (marca Nutrimon®)	1000	2.64 USD	0.5	0.00132 USD
Cloruro de sodio (marca Refisal®)	500	0.20 USD	0.2	0.00008 USD
			Total (g L ⁻¹)	0.02107 USD

PPT: Presentación del producto; PC: Precio comercial; Cant.: Cantidad; USD: Dólares americanos.

Estimulación de biomasa en plántulas de ñame espino por rizobacterias producidas en medios de cultivo agroindustriales

La producción de biomasa aérea y radicular, y de pigmentos fotosintéticos de clorofila en plántulas de ñame espino fue estimulada por rizobacterias y multiplicadas en los medios de cultivo agroindustrial optimizados en la etapa I de esta investigación, por lo tanto, estos medios de cultivo pueden emplearse para multiplicar estos microorganismos (Figura 5).

El análisis de varianza para la variable PFRESA arrojó que la acumulación de peso en los tejidos aéreos de la planta de ñame espino no fue influenciada de forma significativa ($p \geq 0.05$), por el efecto individual de las rizobacterias o la dosis de inóculo empleada, ni tampoco por la interacción de estos factores ($p = 0.2272$). Sin embargo, en la Figura 5A, se puede observar que la inoculación con DCR11 *A. vinelandii* en dosis de 6 mL⁻¹ incrementó en 33.2% la producción de biomasa fresca aérea con respecto a las

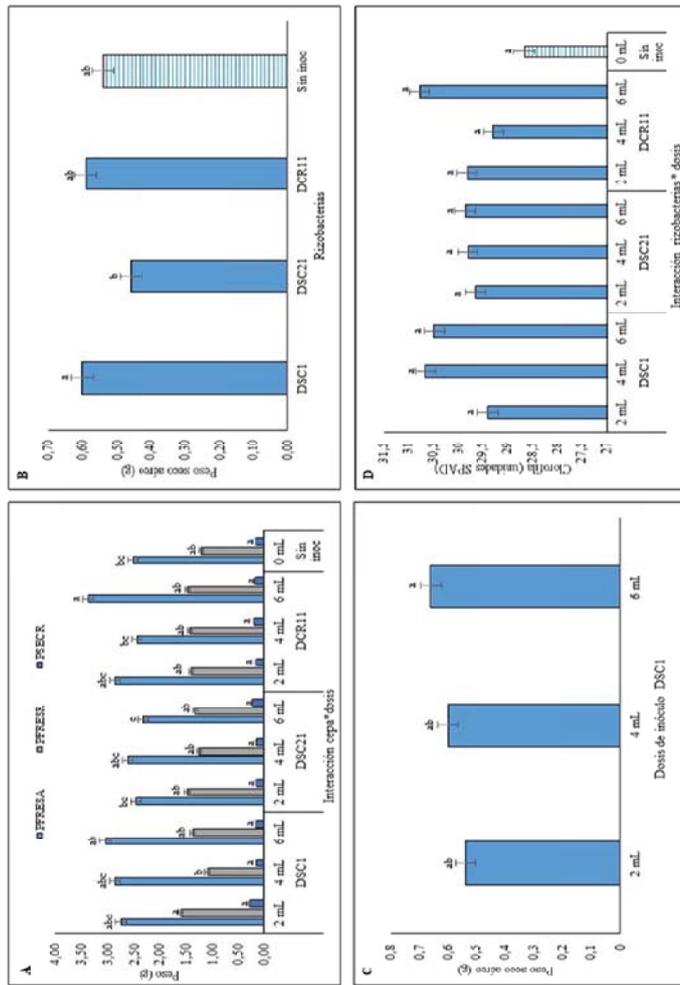


Figura 5: efecto de rizobacterias en la producción de biomasa del ñame espino. A) efecto de rizobacteria y dosis de inóculo en el PFRESA, PFESE y PSECR. B) Efecto de rizobacterias en el peso seco aforo. C) Efecto de la dosis de inóculo DSC1 B. licheniformis en el PSECR. D) efecto de rizobacterias en la producción de clorofilas (unidades SPAD). *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$); las barras indican el error estándar de la media.

Figure 5: effect of rhizobacteria on hawthorn yam biomass production. A) effect of rhizobacteria and inoculum dose in PFRESA, PFESE and PSECR. B) Effect of rhizobacteria on air-dry weight. C) Effect of the dose of DSC1 B. licheniformis inoculum on the PSECR. D) effect of rhizobacteria on chlorophyll production (SPAD units). * Means with a common letter are not significantly different ($p \geq 0.05$); the bars indicate the standard error of the mean.

no inoculadas. Las investigaciones realizadas por Baddour y Sakara (2020) en *Solanum tuberosum* cv. sponta demuestran que la inoculación de *Azotobacter* sp., incrementó significativamente en 8.39% la materia seca de las plantas. Las bacterias del género *Azotobacter* constituyen un componente eficaz de la estrategia integrada de nutrición vegetal, que contribuye positivamente a la producción agrícola sostenible (Delshadi *et al.*, 2017). Tiene impactos beneficiosos en la producción vegetal, debido a su capacidad de fijar nitrógeno (Aasfar *et al.*, 2021), solubilizando fosfatos (Nosrati *et al.*, 2014) y a la secreción microbiana de fitohormonas estimulantes, como giberelinas, auxinas y citoquininas (Arora *et al.*, 2018).

Por otra parte, los análisis estadísticos no detectaron efecto significativo ($p \geq 0.05$) sobre el PFRESR de los factores en estudio o la interacción de estos (Figura 5A). No obstante, la rizobacteria DSC1 *B. licheniformis* en dosis de 2 mL^{-1} estimuló en 31.67% la acumulación de biomasa fresca en las raíces en relación al control sin inoculación. Las especies del género *Bacillus* son bacterias endofíticas, aeróbicas y formadoras de esporas que presentan adaptabilidad a condiciones de estrés ambiental y huéspedes (Kwon *et al.*, 2021), es muy probable que los efectos promotores del crecimiento de estas PGPRs sobre la acumulación de peso fresco radicular se deban a la producción bacteriana de reguladores del crecimiento como el ácido indol-3-acético (AIA), también, puede atribuirse al aumento de la adquisición de nutrientes, como la solubilización de fosfato (Gowda *et al.*, 2018). Los *Bacillus* producen exopolisacáridos, lo cual, aumenta la capacidad de colonización de raíces y las ayuda a adherirse firmemente a la superficie de la raíz (Niu *et al.*, 2018).

En cuanto a la variable peso seco radicular (PSECR) los análisis estadísticos determinaron que la inoculación de rizobacterias bajo diferentes dosis de inóculo no influye de manera significativa ($p \geq 0.05$) en este parámetro de crecimiento de las plantas de ñame espino. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los obtenidos por Sánchez-López y Pérez-Pazos (2018) quienes al evaluar bajo condiciones controladas la DSC1 *B. licheniformis* y DSC21 *B. laterosporus* no detectaron incrementos en el peso radical de las plantas con respecto al control sin inocular transcurridos 60 días después de la inoculación.

Con relación a la variable peso seco aéreo, los análisis estadísticos detectaron interacción significativa ($p \leq 0.0389$) entre las rizobacterias y las dosis de inóculo, por lo tanto, la combinación de estos dos factores influye notoriamente sobre la producción de materia seca en el follaje de las plantas de ñame espino. En la Figura 5B, se puede apreciar que la rizobacteria DSC1 *B. licheniformis* fue la que produjo la mayor cantidad de materia seca (0.60 g). Esta rizobacteria puede incrementar en 22.22% el peso seco aéreo al ser inoculada con una dosis de 6 mL^{-1} (Figura 5C). Por lo tanto, *B. licheniformis* podría utilizarse como un bioestimulante potencial para mejorar la productividad de los cultivos de ñame. Este hallazgo está respaldado por informes de Akhtar *et al.* (2020), que demuestran que *B. licheniformis* FMCH001 recubierto en semillas de maíz mejoro en 15% la acumulación de materia seca en brotes y raíces de las plantas bajo condiciones de sequía. Esta bacteria puede sobrevivir a condiciones estresantes dada su alta competitividad en la rizosfera del cultivo y su capacidad de formación de biopelículas mediadas por Quorum Sensing (QS) (Ortiz-Castro y López-Bucio, 2019).

Investigaciones recientes han informado que especies del género *Bacillus* spp., tienen la capacidad de producir fibras amiloides en la superficie de la raíz, lo cual, constituye una estrategia para competir de forma eficiente con otros microbios en la rizosfera y colonizar mejor las raíces de las plantas, generando así efectos beneficiosos como aumentos en la producción de materia seca del follaje y raíces, tolerancia a sequía y elaboración de metabolitos secundarios (Arnaouteli *et al.*, 2021).

La producción de pigmentos fotosintéticos de clorofila (unidades SPAD) no presentó efecto significativo ($p \geq 0.05$) de la interacción de los factores (rizobacteria*dosis) o de su efecto individual, sin embargo, se registraron incrementos en la producción con la inoculación de las DSC1 *B. licheniformis* y DCR11 *A. vinelandii* (Figura 5D). Estas rizobacterias generan efectos beneficiosos para la producción de fotoasimilados en la planta de ñame debido a que pueden estimular la producción de los mismos, la DCR11 *A. vinelandii* en dosis de 6 mL^{-1} generó incrementos en 7.36% y DSC1 *B. licheniformis* a una dosis de 4 mL^{-1} del 6.95% en comparación con las plantas no inoculadas. Las rizobacterias con capacidad de promover el crecimiento vegetal tiene la capacidad de mejorar de forma indirecta la producción de pigmentos fotosintéticos en la planta debido a que mejoran el suministro de CO_2 (Zhang *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

La elaboración de medios de cultivo a partir de fuentes agroindustriales como Azúcar común y levadura seca favorece el crecimiento y producción de la fitohormona citoquininas en las rizobacterias DSC1 *B. licheniformis*, DSC21 *B. laterosporus* y DCR11 *A. vinelandii*. Los medios de cultivo optimizados pueden ser empleados para multiplicar las rizobacterias y realizar inoculaciones en plantas de ñame, generando incrementos en los parámetros de crecimiento y producción de pigmentos fotosintéticos. Por lo tanto, el uso de rizobacterias con características como PGPRs constituye un enfoque prometedor para mejorar la resiliencia de los cultivos de ñame en la región Caribe de Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombiano bajo el convenio TV19 con Agrosavia. Este trabajo formó parte del proyecto “Desarrollo de tecnologías para el manejo y producción de semillas de calidad para mejorar la uniformidad y productividad del cultivo ñame de la región Caribe”.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, Hilali A, Ben- nis I, Zeroual Y, Meftah Kadmiri I. 2021. Nitrogen Fixing *Azotobacter* Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Front Microbiol.* 12: 1-19.
- Akhtar SS, Amby DB, Hegelund JN, Fimognari L, Grobkinsky DK, Westergaard JC, Roitsch T. 2020. *Bacillus licheniformis* FMCH001 increases water use efficiency via growth stimulation in both normal and drought conditions. *Front Plant Sci.* 11 (297): 1-12.
- Arnaouteli S, Bamford NC, Stanley-Wall NR, Kovács ÁT. 2021. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nat Rev Microbiol.* 1-15.
- Arora M, Saxena P, Abidin, MZ, Varma, A. 2018. Interaction between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* governs better plant physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua* L. plants grown under in vitro conditions. *Symbiosis.* 75 (2): 103-112.
- Baddour AG, Sakara, HM. 2020. Bio-fortification of Potato Plants with different Nitrogen Rates and Applied Iron Forms in Presence and Absent of *Azotobacter* sp. *Egypt J Soil Sci.* 60 (4): 449-467.
- Bharti N, Sharma SK, Saini S, Verma A, Ni- monkar Y, Prakash O. 2017. Microbial plant probiotics: problems in application and formulation. In: V. Kumar y col. (eds.). In *Probiotics and Plant Health: Editions Springer Singapore*, Pp. 317-335.
- Box GE, Behnken DW. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics.* 2 (4): 455-475.
- Chaudhary T, Shukla P. 2020. Commercial Bio- inoculant Development: Techniques and Challenges. In: Shukla P, editor. *Microbial Enzymes and Biotechniques*. Singapore: Edition Springer Nature. Pp. 57-70.
- Cobo CF. 2017. Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis*. [Tesis de pregrado]. [Quito]: Universidad Politécnica Salesiana.
- Contreras Santos JL, Martínez Atencia J, Cadena Torres J, Novoa Yanez RS, Tamara Morelos R. 2020. Una evaluación de las propiedades fisicoquímicas de suelo en sistema productivo de maíz-algodón y arroz en el Valle del Sinú en Colombia. *Rev UDCA Act Divulg Cient.* 23 (2): e1375.
- Delshadi S, Ebrahimi M, Shirmohammadi E. 2017. Effectiveness of plant growth promoting rhizobacteria on *Bromus tomentellus* Boiss seed germination, growth and nutrients uptake under drought stress. *S AFR J BOT.* 113: 11-18.
- Gowda VR, Henry A, Yamauchi A., Shashidhar HE, Serraj R. 2011. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Res.* 122 (1): 1-13.
- El-Tarabily KA, Nassa, AH, Hardy GESJ, Sivasithamparam K. 2003. Fish emulsion as a food base for rhizobacteria promoting growth of radish (*Raphanus sativus* L. var. sativus) in a sandy soil. *Plant Soil.* 252 (2): 397-411.
- Hazra C, Kundu D, Ghosh P, Joshi S, Dandi N, Chaudhari A. 2010. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low cost agro based raw materials. *J Chem Technol Biotechnol.* 86 (2): 185-198.
- Kalyanasundaram GT, Syed N, Subburamu K. 2021. Recent developments in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. In: Viswanath B, editor. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Tirupati, Andhra Pradesh, India: Editions Academic Press. Pp. 181-192.

- Kwon JH, Won SJ, Moon JH, Lee U, Park YS, Maung CEH, Ahn YS. 2021. *Bacillus licheniformis* PR2 Controls Fungal Diseases and Increases Production of Jujube Fruit under Field Conditions. *Horticulturae*. 7 (3): 1-11.
- Li H, Qiu Y, Yao T, Ma Y, Zhang H, Yang X. 2020. Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil Tillage Res.* 199: 104577.
- Loffy WA. 2007. The utilization of beet molasses as a novel carbon source for cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*: optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresour Technol.* 98 (18): 3491-3498.
- Niu X, Song L, Xiao Y, Ge W. 2018. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. *Front Microbiol.* 8: 1-11.
- Nosrati R, Owlia P, Saderi H, Rasooli I, Malboobi MA. 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran J Microbiol.* 6 (4): 285-295.
- Ortiz-Castro R, López-Bucio J. 2019. Phytostimulation and root architectural responses to quorum-sensing signals and related molecules from rhizobacteria. *Plant science.* 284: 135-142.
- Osugi A, Sakakibara H. 2015. Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance?. *BMC Biol.* 13 (1): 1-10.
- Plackett R, Burman J. 1946. El diseño de experimentos multifactoriales óptimos. *Biometrika.* 33: 305-325.
- Poveda J. 2021. Insect frass in the development of sustainable agriculture. A review. *Agron Sustain Dev.* 41 (1): 1-10.
- Romeiro RS. 2007. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. UFV Viçosa: Viçosa, Brazil.
- Sánchez-López DB, Pérez-Pazos JV. 2018. Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata in vitro*. *Agron costarric.* 42 (2): 75-91.
- Verma PP, Shelake RM, Sharma P, Kim JY, Das S, Kaur M. 2020. Microbes in Crop Production: Formulation and Application. In Sharma SG, Sharma NR, Sharma M, editores. *In Microbial Diversity, Interventions and Scope.* Singapore: Edition Springer Nature. Pp. 51-73.
- Zhang M, Yang L, Hao R, Bai X, Wang Y, Yu X. 2020. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria isolated from jujube (*Ziziphus jujuba*) and their potential to enhance drought tolerance. *Plant Soil.* 452 (1): 423-440.