

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO DE LOS SANTOS**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON  
ENFÁSIS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SOSTENIBLE**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO VEGETAL: UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA LA  
FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN ARROZ**

**JOSÉ LUIS CAUSADÍAS SAMANIEGO  
8-413-552**

**PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ  
2023**

**Universidad de Panamá**  
**Centro Regional Universitario de Los Santos**  
**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Maestría en Producción Agrícola Sostenible**

**Caracterización de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal: Una Alternativa**  
**Sostenible para la Fertilización Nitrogenada en Arroz**

**Estudiante: José Luis Causadías Samaniego**

**8-413-552**

**II Semestre**

**2023**

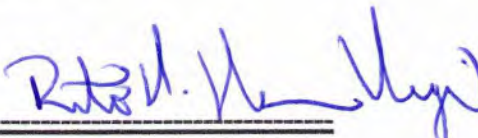
**Tesis de Maestría**

**Sometido para optar por el título de Maestría en Producción Agrícola Sostenible**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**APROBADO:**

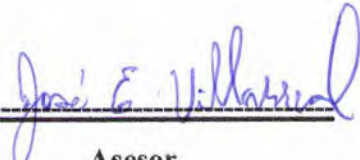
**Dr. Rito Herrera**



Handwritten signature of Rito Herrera in blue ink, written over a double horizontal line.

**Asesor principal**

**Dr. José Villarreal**



Handwritten signature of José Villarreal in blue ink, written over a double horizontal line.

**Asesor**

**M.Sc. Ulises Pino**



Handwritten signature of Ulises Pino in blue ink, written over a double horizontal line.

**Asesor**

**REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2023**

## **DEDICATORIA**

A mis hijos Jezabell Mercedes Causadías Jaén, José Jafet Causadías Jaén, quienes me inspiraron y me dieron las fuerzas necesarias para concluir esta etapa de mi vida. A mi esposa Mercedes Jaén, por su motivación en los momentos más difíciles en este proceso académico.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá, por brindar sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación, a la secretaria nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (SENACYT) y la Universidad de Panamá.

A mi asesor de tesis, Dr. Rito Herrera por compartirme sus conocimientos y brindarme su tiempo y apoyo durante la realización de este trabajo; a las siguientes personas por el apoyo: Betzaida Bernal (IDIAP), Estibaliz Wilkie (UP), Carmen Bieberach (IDIAP), Sanya Aguilar (IDIAP), Alexander Martínez (GORGAS), Celestino Aguilar (GORGAS), Claudia González (GORGAS), Jessica Góndola (GORGAS), Ámbar Moreno (GORGAS), Oris Chavarría (GORGAS), Silvino Sánchez (Productor).

## ÍNDICE GENERAL

<b>Encabezado.....</b>	<b>I</b>
<b>Firma Comité Asesor.....</b>	<b>II</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimiento.....</b>	<b>IV</b>
<b>Indice General.....</b>	<b>V</b>
<b>Índice de tablas.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Índice de gráficas y figuras.....</b>	<b>IX</b>
<b>Índice de anexos.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de acrónimos y abreviaturas.....</b>	<b>XI</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XV</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Planteamiento del Problema.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>4</b>
<b>Marco Teorico.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Importancia de la fertilización en el cultivo de arroz.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Fertilización nitrogenada en el cultivo de arroz.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Nitrógeno en el suelo.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1. Transformación de nitrógeno en el suelo.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Fijación biológica de nitrógeno.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1. Fijación no simbiótica.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2. Bacterias Aeróbicas heterótrofas.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.3 Bacterias Anaeróbicas.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.4 Bacterias Fotosintéticas.....</b>	<b>9</b>

1.4.5 Fijación Simbiótica con No Leguminosa.....	10
1.5 Sideroforos.....	13
1.6 Solubilizadores de Fósforo.....	14
1.7 Ácido Indolacético.....	15
1.8 Característica del cultivar IDIAP FL 069-18.....	16
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>17</b>
<b>2.0 Materiales y Métodos.....</b>	<b>17</b>
2.1 Origen de la muestra.....	17
2.2 Etapa I Bioprospección de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal....	17
2.2.1 Producción de Sideróforos.....	19
2.2.2 Medición de la Reacción CAS.....	20
2.2.3 Producción de Ácido Indolacético.....	20
2.2.3.1 Curva patrón AIA.....	21
2.3 Curva de Crecimiento.....	22
2.4 Identificación Molecular.....	22
2.4.1 Cuantificación de ADN.....	23
2.4.2 Electroforesis en gel.....	23
2.4.3 Caracterización molecular.....	23
2.5 Etapa II Prueba en macetas.....	23
2.6 Etapa III Eficacia en dos localidades.....	25
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>27</b>
<b>3.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
3.1 Análisis Físico-Químico del Suelo.....	27
3.2 Actividad Enzimática de la Deshidrogenasa.....	28
3.3 Producción de Sideróforos.....	30
3.4 Producción de Ácido Indolacético (AIA).....	31
3.5 Curva de Crecimiento.....	33
3.6 Identificación Molecular.....	35
3.6.1 Electroforesis en Gel Agarosa.....	36

<b>3.7 Etapa II Siembra en Maceteros</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7.1 Altura de Planta en el Tiempo</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7.2 Altura de Planta a la Cosecha</b> .....	<b>39</b>
<b>3.7.3 Rendimientos en gramos</b> .....	<b>41</b>
<b>3.8 Etapa III Eficacia Biológica en Las Localidades</b> .....	<b>43</b>
<b>3.8.1 Localidad de Cabuya</b> .....	<b>43</b>
<b>3.8.2 Localidad El Bajo</b> .....	<b>47</b>
<b>Capitulo IV</b> .....	<b>53</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>53</b>
<b>Recomendaciones</b> .....	<b>54</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>55</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Soluciones curva patrón (AIA) .....</b>	<b>21</b>
<b>Tabla 2. Número de tratamientos en macetas .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 3. Identificación de los tratamientos.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 4. Arreglo topológico estudio en campo .....</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 5. Ánalsis físico-químico de suelo .....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 6. Estimación cuantitativa de sideróforos .....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 7. Medida de producción de AIA.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 8. Concentración de ácido nucleico .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 9. Programa 16 ARN ribosomal .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 10. Secuenciación.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 11. Identificación molecular .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 12. Análisis de varianza Altura de planta .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 13. Análisis de varianza Hijos por planta .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 14. Análisis de varianza rendimiento en gramos.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 15. Probabilidad prueba de Shapiro-Wilk (Cabuya).....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 16. Probabilidad prueba de Shapiro-Wilk (El Bajo) .....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Diseño pentagonal, toma de muestra .....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2. Esquema utilizado para la dilución seriada .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3. Respitración microbiana.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 4. Producción de sideróforos. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5. Curva de crecimiento <i>Lysinibacillus fusiformis</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 6. Curva de crecimiento <i>Bacillus cereus</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7. Producto de PCR .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 8. Altura de planta en el tiempo .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 9. Altura de planta día de cosecha .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 10. Cantidad de hijos por planta.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 11. Rendimiento en gramos .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 12. Normalidad de los datos (Cabuya).....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 13. Rendimiento en gramos ( Cabuya) .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 14. Altura de planta (Cabuya).....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 15. Hijos por planta (Cabuya).....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 16. Cantidad de espigas por planta (Cabuya).....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 17. Normalidad de datos (El Bajo).....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 18. Rendimiento en gramos (El Bajo).....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 19. Número de espigas por planta (El Bajo) .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 20. Número de hijos por planta( El Bajo) .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 21. Altura de planta (El Bajo) .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 22. Rendimiento dos localidades .....</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.. Crecimiento de cepas en medio Ashby, Fig-23 y 24.....</b>	<b>69</b>
<b>Anexo 2. Germinación y Crecimiento IDIAP-FL 069-18, Fig-25 y 26.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo 3. Crecimiento de plantas en macetas, Fig-27 y 28 .....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo 4. Lectura del peso en gramos, Fig-29 y 30.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo 5. Vigor de plantas 15 días después de siembra, Fig 31 y 32.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo 6. Localidades. Cabuya y El Bajo, Fig 33 y 34.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURA

- ANOVA: Análisis de la Varianza
- Ar: Absorbancia de referencia
- As: Absorbancia de la muestra
- BPCV: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
- BSF: Bacterias Solubilizadora de Fósforo
- Ca: Calcio
- CAS: Cromoazurol S
- Cu: Cobre
- EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FBN: Fijación biológica de nitrógeno
- Fe: Hierro
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : Tricloruro de hierro hexahidratado
- $\text{FePO}_4$ : fosfato de hierro
- g: Gramos
- HDTMA: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- ICA: Instituto Colombiano Agropecuario
- IDIAP: Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá
- K: Potasio
- kg: kilogramo
- L: Litro
- MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

- meq/100g: milequivalentes por 100 gramos de suelo
- Mg: Magnesio
- mg: Miligramo
- MIDA: Ministerio de Desarrollo Agropecuario
- mL: Mililitro
- MM: Microorganismos de Montaña
- mm: Milímetro
- Mn: Manganeso
- msnm: Metros sobre el nivel del mar
- N: Nitrógeno
- N<sub>2</sub>: Nitrógeno atmosférico
- NaOH: Hidróxido de sodio
- NH<sub>4</sub>: Amonio
- nm: Nanómetro
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- P: Fósforo
- ppm: Partes por millón
- PSI: Índice de solubilización de fosfato
- psu: Unidad porcentual de sideróforo
- PVK: Pikovskaya
- rpm: Revolución por minuto
- TSA: Agar Trypticase Soja
- UFC: Unidad formadora de Colonias

## RESUMEN

En Panamá se realizan análisis de suelo como herramienta para determinar la dosis óptima de fertilizantes en el cultivo del arroz, la cual se ha convertido en una actividad que deberían realizar todos los productores a nivel nacional, para cada área, tipo de suelo y variedad de arroz a sembrar existe una dosis diferente. Para el cierre del año agrícola marzo del 2020, el costo de la fertilización (Fertilizante Completo + UREA 46%) por hectárea estaba por los \$278.14 (MIDA, 2020). El nitrógeno es el elemento más importante para la alta productividad del arroz. La fuente inorgánica de nitrógeno más común es la urea. La fijación del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), junto con la fotosíntesis y la respiración, se considera uno de los procesos bioquímicos más importantes en la naturaleza. Consiste en la conversión de este gas dinitrógeno inerte en N reactivo que se vuelve disponible para todas las formas de vida a través del ciclo del N. Es llevado a cabo por un número limitado de bacterias conocidas como organismos diazotófos. El objetivo principal de esta investigación fue caracterizar microorganismos nativos promotores de crecimiento vegetal como alternativa en la fertilización nitrogenada del cultivo de arroz, para ello se realizó la bioprospección y caracterización bioquímica de microorganismos nativos y se evaluó la eficacia biológica de estos. Se identificaron molecularmente el *Lysinibacillus fusiformis* y el *Bacillus cereus* mediante secuenciación del 16S RNArribosomal y secuenciación del genoma completo, estas bacterias fueron capaces de crecer en medio libre de nitrógeno (Ashby), producir fitosideróforos y ácido indolacético. En las pruebas de eficacia biológica tanto en casa de vegetación como parcela experimental se observaron diferencias estadísticas significativas en relación con la altura de la planta (mayor altura) de arroz en el tratamiento con bacterias en relación con los métodos convencionales de fertilización nitrogenada, también los tratamientos con

bacterias produjeron un mayor número de hijos por planta (macollamiento), de manera similar hubo una mayor producción de granos en comparación con los testigos. Se identificaron molecularmente las bacterias *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus. fusiformis*

## ABSTRACT

In Panama, soil analysis is carried out as a tool to determine the optimal dose of fertilizers in rice cultivation, it has become an activity that should be carried out by all producers at the national level, for each area, type of soil and variety of rice at sow there is a different dose. By the end of the agricultural year, March 2020, the cost of fertilization (Complete Fertilizer + UREA 46%) per hectare was \$278.14 (MIDA, 2020). Nitrogen is the most important element for high rice productivity. The most common inorganic source of nitrogen is urea. Fixation of atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>), together with photosynthesis and respiration, is considered one of the most important biochemical processes in nature. It consists of the conversion of this inert dinitrogen gas into reactive N that becomes available to all life forms through the N cycle. It is carried out by a limited number of bacteria known as diazotrophic organisms. The main objective of this research was to characterize native microorganisms that promote plant growth as an alternative in nitrogen fertilization of rice crops, for which bioprospecting and biochemical characterization of native microorganisms was carried out and their biological efficacy was evaluated. They were molecularly identified as belonging to the species *Bradyrhizobium elaeagnanum*. These bacteria were capable of growing in a nitrogen-free medium (Ashby), producing phyto siderophores and indoleacetic acid. In the biological efficacy tests, significant statistical differences were observed in relation to the height of the plant (greater height) of rice in the treatment with bacteria in relation to the conventional methods of nitrogen fertilization, also the treatments with bacteria produced a greater number of tillers per plant (tillering), similarly there was a higher production of grains compared to the controls.

## INTRODUCCIÓN

La planta de arroz requiere de gran cantidad de nitrógeno durante todo el ciclo, ya que afecta todos los parámetros que contribuyen al rendimiento. El N es un constituyente esencial de los aminoácidos, ácidos nucleicos y de la clorofila, en concentraciones en la hoja está relacionado a la tasa de fotosíntesis en las hojas y a la producción de biomasa (Dóberman y Fairhurst, 2005).

Entre los principales beneficios del nitrógeno en el cultivo destacan los siguientes:

- Favorece el desarrollo rápido.

- Incrementa la altura de la planta, el número de tallos y el tamaño de la hoja.

- Aumento del número de granos por panícula, el porcentaje de granos llenos y el contenido proteico del grano (Montero et al., 2017).

La fertilización nitrogenada es la clave de una buena producción, tanto en cantidad como en la forma de aplicación. Se recomienda fraccionar la dosis para maximizar la absorción del fertilizante y reducir el riesgo de pérdidas, particularmente en el inicio de la panícula, ya que repercute positivamente en un incremento de la producción mediante el aumento del número y peso de los granos por panícula (Montero et al., 2017).

En la actualidad, los productores realizan fertilización nitrogenada basada en compuestos químicos de origen sintéticos, el uso indiscriminado trae como consecuencia daños ambientales como la contaminación de acuíferos. El nitrógeno inorgánico está constituido por las formas solubles como nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) intercambiable y no intercambiable fijado en las arcillas (Rutherford et al., 2007). Los promotores de crecimiento vegetal (PCV), son un grupo diferentes de especies que pueden incrementar el crecimiento y productividad en las

plantas, permite mejorar la fertilización química al suelo, generando de esta forma prácticas más amigables con la salud del suelo y el ambiente (Gonzales y Fuentes, 2017).

Para conseguir el mayor beneficio de los microorganismos rizosféricos en la nutrición vegetal, es necesario conocer en profundidad los mecanismos utilizados por las plantas para adquirir los nutrientes del suelo y también, los mecanismos implicados en su relación con dichos microorganismos. Hay microorganismos que pueden establecer simbiosis con las plantas y favorecer la absorción de elementos, como es el caso de las micorrizas y el fósforo (P) o las bacterias fijadoras de nitrógeno (N) del género *Rhizobium sp* y las leguminosas. Estos microorganismos simbioses también pueden afectar la nutrición de otros elementos esenciales para las plantas (González-Guerrero et al., 2016).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los componentes básico de la dieta del panameño. En tierras agrícolas el nitrógeno se encuentra principalmente como nitratos; los nitratos no se retienen en el suelo, sino que presentan alta movilidad a través del flujo del agua. Debido a los altos costos de la aplicación nitrogenada, que están 148.14 balboas (MIDA, 2020), pretendemos usar los microorganismos promotores de crecimiento vegetal como alternativa a esta problemática, en este estudio buscamos reducir los costos de las fertilizaciones nitrogenadas en un 20%. Se plantea el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal como alternativa a estos costos, para ello se intenta reducir gradualmente las aplicaciones nitrogenadas en arroz. Los promotores de crecimiento vegetal (PCV), son un grupo diferente de especies que pueden incrementar el crecimiento y productividad en las plantas, permite mejorar la fertilización química al suelo, generando de esta forma prácticas más amigables con la salud del suelo y el ambiente (Gonzales y Fuentes, 2017).

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar microorganismos nativos promotores de crecimiento vegetal como alternativa en la fertilización nitrogenada del cultivo de arroz.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar bacterias promotoras de crecimiento vegetal asociados al cultivo del arroz.
- Desarrollar ensayos de eficacia biológica de microorganismos nativos promotores de crecimiento vegetal.
- Identificar molecularmente los microorganismos más promisorios previamente aislados en suelos de cultivo de arroz.

## **1.0 MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Importancia de la Fertilización en el cultivo del arroz**

La nutrición en el cultivo del arroz es uno de los principales factores que inciden en su crecimiento y producción, de esta manera pueden expresar todo su potencial de rendimiento. El suministro de nutrientes a las plantas de arroz requiere de una cantidad esencial para completar su ciclo de vida, donde el carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno (O) son tomados del aire, el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), considerados como elementos mayores tomados del suelo; sin embargo, la mayoría de nuestros suelos son deficientes de ellos. Por eso, la necesidad de aplicarlos como fertilizantes. La cantidad requerida por la planta dependerá de su potencial de producción sujeto a las condiciones climáticas, al suelo y a la variedad (Lozano y Ospina, 2019).

La materia orgánica es considerada la llave de la fertilidad del suelo, ya que ella no sólo proporciona nutrientes, sino que también favorece las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo. La materia orgánica es la fuente que contiene la reserva de nitrógeno, para la nutrición vegetal y proporciones considerables de fósforo, potasio y azufre; además es fuente de energía para la población microbiana del suelo (Lozano y Ospina, 2019).

Los fertilizantes orgánicos contribuyen a optimizar el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Albuquerque et al., 2010; Koller et al., 2014; Myint, et al., 2010). También están relacionados al mejoramiento de los suelos (Bertsch, 2003; Meléndez, 2003; Vandevivere y Ramírez, 1995). Las comunidades microbianas en los suelos se consideran vitales para asegurar la sostenibilidad de los ecosistemas (Barrios, 2007; Chaparro et al., 2012; Eisenhauer et al., 2010; Mendes et al., 2011; Young y Crawford, 2004). Estos cumplen funciones tales como: el ciclaje de

nutrientes, el mantenimiento de la estructura del suelo y la regulación de las poblaciones biológicas (Castro et al., 2009; Singh et al., 2011, Kibblewhite et al., 2015).

El pH puede variar desde 0 a 14 y de acuerdo con esta escala los suelos se clasifican en: suelos ácidos con pH inferior a 5,5, suelos neutros con pH entre 6,6 y 7,5 y suelos básicos con pH superior a 7,5. De acuerdo con el pH, la disponibilidad de los nutrientes varía según el elemento, en el caso de nitrógeno está en un rango de 6.0-8.0 (Blanco, 2003).

### **1.2 Fertilización nitrogenada en el cultivo del arroz**

En Panamá se realizan ensayos en diferentes suelos y con diferentes variedades y dosis de fertilizantes en el cultivo del arroz, lo cual se recomienda realizar a los productores a nivel nacional, para cada región, tipo de suelo y variedad de arroz. Para el cierre del año agrícola 2020, el costo de la fertilización (Fertilizante Completo + UREA 46%) por hectárea fue de 278.14 balboas (MIDA, 2020).

El balance nutricional de la planta es importante para la tolerancia al estrés, ya sea biótico o abiótico. Por lo tanto, es necesario efectuar los análisis de suelo a las parcelas antes de la siembra en cada ciclo, para determinar con precisión las deficiencias del suelo y suplir éstas con fertilizantes, lo que evitará desbalance en la aplicación de nutrimentos. La aplicación de nitrógeno debe ser fraccionado a un nivel inferior de 100 kg/ha, aunque en algunas regiones se puede aplicar hasta 130 kg/ha (Camargo et al., 2014).

### **1.3 Nitrógeno en el Suelo**

El nitrógeno (N) es un elemento esencial, considerado un macronutriente, para todos los seres vivos. Además de ser un componente específico de las proteínas, está presente en la mayor parte de las combinaciones orgánicas de los vegetales. Actualmente está demostrado, que es el factor limitante más común del crecimiento de las plantas, y que un deficiente suministro de este

nutriente, puede provocar notables descensos en la producción vegetal. A su vez, directa o indirectamente, es fuente de las sustancias proteicas que aseguran la nutrición del hombre y de los animales en general. Tanto sus deficiencias como sus excesos en los suelos, tienen gran impacto en la salud y en la productividad de los ecosistemas mundiales. Más allá de que la atmósfera posee, en volumen, un 78 % de N, es un gas diatómico ( $N_2$ ) y una molécula formada por dos átomos de nitrógeno unido por un enlace triple estable (Ochardson, 2020).

La transformación de nitrógeno ocurre por la descomposición y mineralización llevada a cabo por los microorganismos del suelo, No es fácil conocer la disponibilidad real de nitrógeno por las dificultades que ocurren con los diferentes métodos para medir la mineralización, como son perturbar el suelo, eliminar raíces, limitar la aireación y el flujo del agua (Celaya y Castellanos, 2011).

El nitrógeno es uno de los nutrientes primarios críticos para la supervivencia de todos los organismos vivos. Es un componente necesario de muchas biomoléculas, incluidas las proteínas, el ADN y la clorofila. Aunque el nitrógeno es muy abundante en la atmósfera como gas dinitrógeno ( $N_2$ ), es en gran medida inaccesible en esta forma para la mayoría de los organismos, lo que convierte al nitrógeno en un recurso escaso y, a menudo, limita la productividad primaria en muchos ecosistemas. Sólo cuando el nitrógeno se convierte de gas dinitrógeno en amoníaco ( $NH_3$ ) se vuelve disponible para los productores primarios, como las plantas.

Además de  $N_2$  y  $NH_3$ , el nitrógeno existe en muchas formas diferentes, incluidas formas tanto inorgánicas (p. ej., amoníaco, nitrato) como orgánicas (p. ej., aminoácidos y ácidos nucleicos). Por lo tanto, el nitrógeno sufre muchas transformaciones diferentes en el ecosistema, cambiando de una forma a otra a medida que los organismos lo utilizan para el crecimiento y, en algunos casos, como energía (Bernhard, 2010).

El nitrógeno presente en suelos cultivables procede de materiales diversos: restos de cultivos, abonos verdes, estiércol, fertilizantes comerciales y nitratos aportados por lluvias, así como por la fijación de N atmosférico por ciertos microorganismos (Cardona y Williams, 2017).

### **1.3.1 Transformaciones del N en el suelo**

#### **Amonificación**

Cuando un organismo excreta desechos o muere, el nitrógeno de sus tejidos se encuentra en forma de nitrógeno orgánico (p. ej., aminoácidos, ADN). Luego, varios hongos y procariotas descomponen el tejido y liberan nitrógeno inorgánico de regreso al ecosistema como amoníaco en el proceso conocido como amonificación. Entonces, el amoníaco queda disponible para que lo absorban las plantas y otros microorganismos para su crecimiento.

#### **Nitrificación**

Es el proceso que convierte el amoníaco en nitrito y luego en nitrato, y es otro paso importante en el ciclo global del nitrógeno. La mayor parte de la nitrificación ocurre aeróbicamente y es realizada exclusivamente por procariotas. Hay dos pasos distintos de nitrificación que son llevados a cabo por distintos tipos de microorganismos. El primer paso es la oxidación del amoníaco a nitrito, que es llevada a cabo por microbios conocidos como oxidantes de amoníaco. Los oxidantes aeróbicos de amoníaco convierten el amoníaco en nitrito a través de la hidroxilamina intermedia, un proceso que requiere dos enzimas diferentes, el amoníaco monooxigenasa y la hidroxilamina oxidorreductasa. El proceso genera una cantidad muy pequeña de energía en relación con muchos otros tipos de metabolismo; como resultado, los nitrosoferos son notoriamente de crecimiento muy lento.

## **Desnitrificación**

La desnitrificación es el proceso que convierte el nitrato en gas nitrógeno, eliminando así el nitrógeno biodisponible y devolviéndolo a la atmósfera. El gas dinitrógeno ( $N_2$ ) es el producto final de la desnitrificación, pero existen otras formas gaseosas intermedias de nitrógeno. Algunos de estos gases, como el óxido nitroso ( $N_2O$ ), se consideran gases de efecto invernadero, reaccionan con el ozono y contribuyen a la contaminación del aire (Bernhard, 2010).

### **1.4 Fijación Biológica de Nitrógeno**

Para que el nitrógeno esté disponible para producir proteínas, ADN y otros compuestos biológicamente importantes, primero debe convertirse en una forma química diferente. El proceso de convertir el  $N_2$  en nitrógeno biológicamente disponible se denomina fijación de nitrógeno  $N_2$ . El gas es un compuesto muy estable debido a la fuerza del triple enlace entre los átomos de nitrógeno, y requiere una gran cantidad de energía para romper este enlace. Todo el proceso requiere ocho electrones y al menos dieciséis moléculas de ATP. Como resultado, sólo un grupo selecto de procariontas puede llevar a cabo este proceso energéticamente exigente. Aunque la mayor parte de la fijación de nitrógeno la llevan a cabo los procariontas, parte del nitrógeno puede fijarse de forma abiótica mediante rayos o ciertos procesos industriales, incluida la combustión de combustibles fósiles.

#### **1.4.1 Fijación no simbiótica**

Es llevada a cabo por ciertos microorganismos de vida libre, presentes en suelos y aguas, que no se encuentran directamente asociados con plantas superiores. En este grupo podemos encontrar:

**1.4.2 Bacterias aeróbicas heterótrofa** *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia*, entre otros. Algunas de estas bacterias pueden actuar también en las hojas de la planta, es decir, a

partir de las exudaciones foliares forman nódulos. Además de fijar el nitrógeno degradan los materiales orgánicos que se depositan sobre la hoja, producen enzimas de crecimiento para la planta y segregan una serie de sustancias que protegen a la planta del ataque de los fitopatógenos.

Las bacterias del género *Azotobacter* presentan movimiento, ya que presentan flagelos peritricos, y aunque son aerobias, también pueden crecer en condiciones de oxígeno bajas. Aunque se pueden llegar a encontrar en suelos ácidos o alcalinos, prefieren aquellos con niveles de pH más neutros. Si no se dieran las condiciones óptimas para su desarrollo pueden llegar a formar quistes (Innovatine, 2019).

**1.4.3 Bacterias anaeróbicas heterótrofas:** Las bacterias anaerobias cuentan con un metabolismo que genera su energía a partir de sustancias que carecen de oxígeno, lo hacen generalmente a través de procesos de fermentación, aunque en ocasiones, como en el caso de las que se encuentran en grietas hidrotermales marinas a grandes profundidades, que lo hacen mediante reacciones que emplean compuestos químicos inorgánicos (Corrales et al., 2015).

**1.4.4 Bacterias fotosintéticas y cianobacterias:** Las bacterias fotosintéticas del azufre forman un grupo diverso de microorganismos. En el resultado de su fotosíntesis no producen oxígeno, razón por la cual también se les conoce como bacterias anoxigénicas (Núñez, 2003).

#### **1.4.5 Fijación simbiótica con no Leguminosas**

Las proteobacterias son uno de los principales grupos de bacterias patógenas de vida libre, e incluyen muchas de las bacterias responsables de la FBN. Son Gram negativas, con pared celular formada principalmente de lipopolisacáridos. Muchas se mueven utilizando flagelos. La mayoría de las proteobacterias son anaerobias, pero hay algunas excepciones. La nutrición es usualmente heterótrofa, pero existen algunos grupos que pueden realizar fotosíntesis. Las proteobacterias se

clasifican en cinco grupos, usualmente considerados clases, los cuales se diferencian por sus secuencias de ARNr. Las clases se denominan según las letras griegas que van desde alpha a epsilon. Según lo expuesto en el cuadro anterior pasaremos a describir algunos rasgos de cada una de las clases nombradas:

- **Alfaproteobacterias:** abarcan la mayoría de los géneros fotótrofos, pero también varios géneros que metabolizan componentes C1, simbioses de plantas y de animales y un grupo de patógenos peligrosos como Rickettsiaceae.
- **Betaproteobacterias:** abarcan varios grupos de bacterias aerobias o facultativas que son altamente versátiles en sus capacidades de degradación. También contienen géneros quimiolitótróficos y algunos fotótrofos.
- **Gammaproteobacterias:** abarcan varios grupos de bacterias importantes para la ciencia y la medicina tales como Enterobacteriaceae, Vibrionaceae y Pseudomonadaceae. Este grupo incluye patógenos importantes como Salmonella, Yersinia, Vibrio, Pseudomonas aeruginosa (Paredes, 2013).

Actualmente, se han acumulado las evidencias de que las propiedades biológicas de un suelo son indicadores tempranos de estrés, haciéndolas idóneas para su uso en los diferentes programas de monitorización (Dick y Tabatabai, 1992).

La sobrepoblación ha incrementado la demanda de alimentos, por lo que agricultores se han visto en la necesidad de buscar métodos de maximización (Salazar y Aldana, 2011). La fertilización de cultivos es una herramienta que permite aumentar la productividad y sustentabilidad de los agroecosistemas (Cassman et al., 2002). Sin embargo, la aplicación de fertilizantes minerales y pesticidas de manera indiscriminada e irresponsable ha acarreado consecuencias en diferentes organismos y sus poblaciones (Badii et al., 2005; Garcés, 2000).

Los indicadores microbiológicos del suelo son aquellos relacionados directa o indirectamente con la estructura y función de los microorganismos. Éstos dan una medida integrada de la calidad del suelo, aspecto que no puede ser obtenido a través del análisis tradicional de variables físico-químicas tales como: pH, capacidad de intercambio catiónico, etc. Los indicadores microbiológicos que más se han utilizado para determinar la calidad del suelo, así como los métodos más usuales de medida (Nielsen et al., 2002).

Los microorganismos benéficos que se aplican al suelo con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización química y mantener así la productividad agrícola (Adesemoye y Kloepper, 2009; Plenchette et al., 2005; Sharma et al., 2012). De igual manera, pueden ser utilizados en semillas, ya que promueven el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta y/o su rizosfera (Bojórquez et al., 2010; ICA, 2006). Estos contribuyen positivamente a la fertilidad del suelo, lo que resulta en un aumento en el rendimiento del cultivo sin causar ningún riesgo ambiental de contaminación del agua o del suelo (Umesha et al., 2014). Un inoculante debe cumplir con adecuada concentración bacteriana, es decir, un inóculo no menor a  $1 \times 10^5$  UFC/mL y especificidad para estimular el crecimiento vegetal (Bashan et al., 2004).

Los microorganismos asimbióticos se encuentran prácticamente en todos los hábitats, como el suelo, el mar, fuentes de agua dulce y sedimentos. Uno de los géneros más utilizados como biofertilizantes es el *Azotobacter sp* (Jiménez, 2007), que también influye en el establecimiento de condiciones óptimas para el desarrollo de una cubierta vegetal estable. Esto es fundamental para que se conserve la calidad del suelo (Suquilanda, 1996). Muchos de los estudios que se han realizado van dirigidos a prácticas agrícolas y forestales, aislando microorganismos de diferentes ambientes, teniendo resultados positivos en cuanto a la producción de biomasa vegetal

de gramíneas como el maíz y los pastos forrajeros. Los datos indican un 60 – 70% de ocurrencia de éxito con un incremento significativo en las cosechas del orden de 5 – 30%, esto atribuido al género *Azospirillum* (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994). Otro estudio indica la alta fijación de nitrógeno a pH 6,8 y 35 °C por la especie *Azospirillum brasilense* en pastos. Del aislamiento de la rizosfera de cultivos de plátano, maíz y rastrojos; las concentraciones más altas del ion amonio exudado al medio, correspondió a 14 cepas del género *Azotobacter* con el valor de 5 mg l<sup>-1</sup>, (Lara et al., 2007). También se ha visto aumento en la materia seca aérea de maíz inoculado con *Azospirillum*, en relación al maíz sin inóculo (Paredes, 2013).

Es pertinente entonces, generar tecnologías basadas en el uso de microorganismos que promuevan procesos naturales como la fijación biológica de nitrógeno (FBN), ya que la mayor parte de este es fijado y directamente disponible en la naturaleza gracias a bacterias y otros microorganismos (Rodríguez, et al., 2014). Este proceso no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico, sino también, revertir o mitigar la degradación del suelo (Mayz, 2004).

Los microorganismos benéficos cumplen funciones que favorecen el crecimiento, la nutrición o la salud de las plantas con quienes interaccionan o bien proporcionan un beneficio directo al ambiente (Morales-García et al., 2010). En el suelo encontramos una gran cantidad de estos, los cuales son importantes en la solubilización de minerales y nutrimentos. En la agricultura presentan una gran cantidad de beneficios como es la descomposición de residuos orgánicos, la detoxificación de plaguicidas, el control de enfermedades en las plantas, la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Loreto et al., 2004). Dentro de esto encontramos las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) las cuales se caracterizan por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas, ya sea directa o indirectamente, estas pueden ser de vida libre o asociativas, aerobias, anaerobias o

anaerobias facultativas (Aguado-Santacruz et al., 2012; Parray et al., 2016; Rodríguez, 1999). La estimulación directa puede incluir fijación de nitrógeno (Sessitsch et al., 2002), producción de hormonas (Perrine et al., 2004), solubilización de fosfatos (Rodríguez, 1999) y secreción de sideróforos (Carson et al., 2000; Madigan y Martinko, 2005).

La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos de biocontrol que son ampliamente reconocidos como la competencia por nicho ecológico o sustratos y la producción de antibióticos (Hassan et al., 1997; Essalmani y Lahlou, 2003). Eliminan de forma natural a los fitopatógenos mediante la producción de metabolitos secundarios que son excretados localmente o cerca de la superficie de la planta (Bloemberg y Lugtenberg, 2001).

Los microbios son ubicuos en la biosfera, y su potencial terapéutico y ecológico no está mucho más explorado y aún necesita explorarse más. Los Bacilos son un grupo heterogéneo de Bacterias Gram negativas y Gram positivas. Los *Lysinibacillus* se encuentran predominante como bacilos grampositivos móviles, formadores de esporas, perteneciente al filo Firmicutes y la familia Bacillaceae. Las especies de *Lysinibacillus* salieron a la luz inicialmente debido a sus propiedades insecticidas y larvicidas. *Bacillus thuringiensis*, un *Lysinibacillus* insecticida bien conocido, puede controlar muchos insectos vectores, incluido un vector de la malaria y otros (Said, 2022).

### **1.5 Los Sideróforos**

El hierro (Fe) es un elemento esencial para las plantas, participa en procesos tan importantes como la fotosíntesis, la respiración y la nutrición de nitrógeno (Marschner, 1995). Con relación a la nutrición férrica, se sabe que la aplicación de algunos microorganismos al suelo puede mejorar el contenido de (Fe) de las plantas (de Santiago et al., 2009; Zhang et al., 2009) y que la homeostasis del hierro en las plantas está estrechamente relacionada con las respuestas defensivas frente al ataque de patógenos (Aznar et al., 2015). Los microorganismos están en íntimo contacto

con el medio ambiente, por lo tanto, se ven afectados por los cambios que ocurran en este. En condiciones normales, el hierro es escaso debido a su rápida oxidación y la consiguiente formación de hidróxidos insolubles. Los complejos que forman los sideróforos con el hierro en el suelo son asimilados eficientemente por los microorganismos que lo producen (Winkelmann, 1991). Se ha demostrado que la concentración de este complejo es en ocasiones lo suficientemente alta para beneficiar la nutrición de las plantas (Crowley et al., 1987). La capacidad de los sideróforos para actuar como supresores de patógenos depende de la planta, del fitopatógeno a controlar, la composición del suelo, la bacteria y la afinidad del sideróforo por el hierro (Dellagi et al., 2009).

### **1.6 Solubilizadores de fósforo**

El fósforo (P) es después del nitrógeno, el elemento más importante para el crecimiento de las plantas y la producción de cultivos. De igual manera es uno de los nutrimentos que más limita las prácticas agrícolas en los trópicos, ya que juega un papel importante en el crecimiento y reparación de células y tejidos (Gordón et al., 2015; Tanwar y Shaktawat, 2003; Rubio, 2002). A menudo en los suelos agrícolas se encuentran grandes reservas de fósforo insoluble, esto debido a la fijación de los fertilizantes fosforados aplicados, por lo que el nutriente no puede ser asimilado por las plantas. Ciertos microorganismos del suelo tienen la capacidad de convertir fosfatos insolubles en solubles, a través del proceso de acidificación, quelación y producción de ácidos orgánicos como el acético ácido glucónico, ácido glicólico, ácido malónico, isobutírico, isovalérico y ácido láctico, etc (Chaiharn y Lumyong, 2011). La inoculación con Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSF) aumenta la disponibilidad de P en la rizosfera y su absorción por la planta (Faria et al., 2013). La respuesta de los cultivos a la fertilización fosfatada depende del nivel de P disponible en el suelo, pero también es afectada por factores del suelo, del cultivo y del manejo del fertilizante.

### 1.7 Ácido Indolacético

El ácido indolacético (AIA) es una auxina producida por plantas, hongos y bacterias, se considera promotora del crecimiento vegetal, por lo que es utilizada en la agricultura (Ozidal et al., 2017). En términos cuantitativos es la auxina de mayor importancia, ya que es una de las fitohormonas fisiológicamente más activas en el crecimiento de las plantas. Es responsable de incrementar tanto el sistema radicular como la absorción de elementos nutritivos (Chandra et al., 2018; Grageda-Cabrera et al., 2012). De igual manera incrementa la biomasa, altura de los tallos, el crecimiento del vástago principal y reduce el crecimiento de ramas laterales (Koshiba, 1993). Es sintetizado por bacterias que están adheridas a la superficie de la semilla, o a la raíz de una planta en vías de desarrollo, es tomado por la planta y junto con el AIA endógeno de la misma puede estimular la división y alargamiento de la célula (Arshad y Frankenberger, 1998).

Los microorganismos que llevan a cabo la FBN son un grupo limitado de bacterias simbióticas y de vida libre denominadas diazótrofes (Bano y Iqbal, 2016). La fijación simbiótica se lleva a cabo en asociación de plantas leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno, llamadas rizobios. Estas colonizan y forman nódulos en las raíces de las plantas donde el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio (Hernández, 1998; Perdomo y Barbazán., 1992; Zuberer, 1998). Mientras que la no simbiótica se encuentra asociada a las partículas del suelo, se da mediante la interacción de las raíces de las plantas al encontrarse los gránulos de suelo adheridos en la rizósfera, donde son capaces de ejercer un conjunto de interacciones producto de la competencia por nutrientes. Una de las principales razones para esa interacción es la liberación de compuestos orgánicos solubles por exudación de la raíz de la planta (Benizri et al., 2001; Bacilio-Jiménez et al., 2003). Las bacterias rizosféricas de vida libre fijan N a través del proceso conocido como "fijación asociativa de nitrógeno" (Kucho et al., 2010).

La preparación de la biblioteca NEXTERA y la secuenciación de Illumina MiSeq® es una técnica bien establecida para generar muestras de alta calidad en este caso con una cobertura de hasta el 89%. En el 2014 se lanza MinION® secuenciador que utiliza tecnología de nanoporos. MinION® identifica bases de ADN midiendo los cambios en la conductividad eléctrica generados como las hebras de ADN pasa a través de un poro biológico (Rivas, 2019).

### **1.8 Características del cultivar IDIAP FL 069-18**

Esta variedad corresponde al pedigrí FL 08242-2P-5-1P-1PM, esta línea fue introducida al país en el año 2009, este cultivar ha mostrado buena adaptabilidad en Panamá, posee características agronómicas favorables, su ciclo vegetativo es intermedio de 114 a 120 días desde la germinación hasta la cosecha, la altura de planta oscila entre 90-97 cm. La floración está entre los 83-88 días después de germinación. La cantidad de semilla que se requiere por hectárea va a depender del método de siembra, del tipo de preparación de terreno, variedad y calidad de la semilla. En condiciones de secano se recomienda utilizar de 114 a 136 kg ha de semilla certificada, lo que garantiza una población inicial de 300 plantas por metro cuadrado, en los sistemas de riego se recomienda de 40 a 97 kg ha de semilla.

El comportamiento a las principales enfermedades del cultivo demostró tolerancia a Piricularia al follaje y cuello de la panícula, escaldado de la hoja, Helminthosporiosis, manchado del grano, espiga erecta y bacteriosis; que son las principales enfermedades del cultivo de arroz en Panamá. El Rendimiento se encuentra entre 3.1 y 3.9 t ha al 14% de humedad, con una estimación de 77.5 a 97 qq ha con humedad en campo. usar el nitrógeno atmosférico, sino también, revertir o mitigar la degradación del suelo (IDIAP, 2019)

## **2.0 Materiales y Métodos**

El ensayo se realizó en tres etapas diferentes:

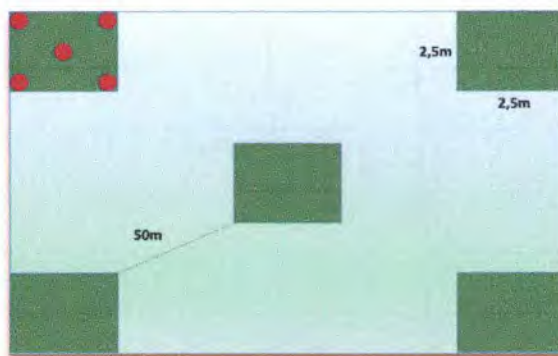
**Etapa I.** El análisis de las cepas bacterianas aisladas, se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola (Centro de Innovación Agropecuaria en Recursos Genéticos) (CIARG), Río Hato provincia de Coclé. 17P 593221 UTM 924535

**Etapa II.** Desarrollo de actividad biológica en macetas de cinco cepas bacterianas inculadas en semillas de arroz, realizada en el Subcentro de Investigación e Innovación Agropecuaria y Forestal de la Cuenca Hidrográfica del Canal de Panamá Las Zanguengas, situado a (17P 0624290 UTM 0990532), seleccionándose dos cepas promisorias.

**Etapa III.** Eficacia biológica en parcelas experimentales. Estudio realizado en las localidades de Dos Torres-Río Hato 17P 593598 UTM 947877 según clasificación de uso de suelos, entra en la categoría II, Bosque muy húmedo tropical, y en La Finca Experimental, El Bajo del Centro de Innovación Agropecuaria Recursos Genéticos, con características de uso tipo I, Bosque seco tropical.

### **2.1 Origen de la Muestra**

La recolección de la muestra de suelo se efectuó mediante el siguiente esquema (figura 1) tomando cinco puntos. Ubicado a 17P 593598 UTM 94787.



**Figura 1.** Diseño Pentagonal para la toma de muestra en campo

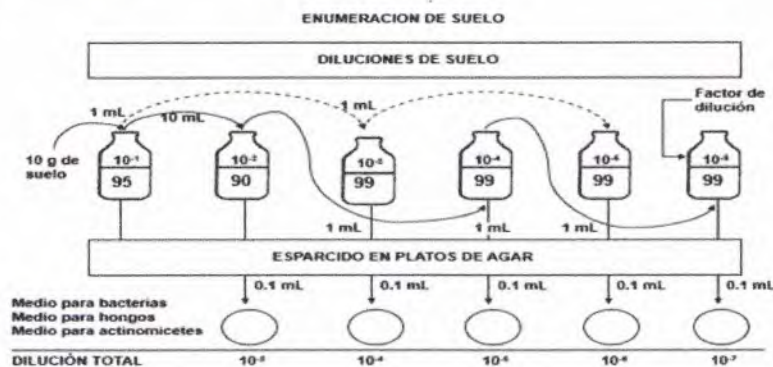
Se tomó una muestra de suelo de 10 cm de profundidad, con una pala manual en una parcela de 500 metros cuadrados, previamente cultivada con arroz, utilizando un sistema de producción orgánico, en Los Torres de Antón. En este sistema de producción no se utilizan productos químicos, las fertilizaciones las realizó aplicando abono orgánico tipo compost que lo produce con los diferentes residuos vegetales que la finca genera. Para el manejo de plagas y enfermedades utiliza Biopreparados caseros. Posteriormente, fueron llevadas al laboratorio para análisis biológicos, físicos y químicos.

### **2.2 Etapa I. Bioprospección de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal.**

Se realizaron aproximaciones experimentales para cuantificar la actividad microbiana en el suelo, mediante la determinación de la respiración microbiana, (dióxido de carbono), (Hernández et al., 2016) y la actividad enzimática de la deshidrogenasa (Casida et al., 1964).

Para el aislamiento de bacterias se tomó una muestra de 10 g de suelo, realizándose una dilución seriada (Hernández et al., 2016), desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ , se inoculó 0,1 ml en

medios de cultivo agar Ashby (libre de nitrógeno) para aislamiento de bacterias fijadoras no simbióticas de nitrógeno.



**Figura 2.** Esquema utilizado para la dilución seriada de suelo. Fuente: Hernández, B.; Cornejo, H.; F. Mejía. 2016. Manual de laboratorio del Curso de Microbiología Ambiental de suelos (Universidad de Panamá).

### 2.2.1 Producción de Sideróforos:

Este ensayo se fundamentó en la competencia por el hierro entre el complejo férrico de un colorante indicador, cromoazurol S (CAS), y un quelante o sideróforo producido por microorganismos (Milagres et al., 1999). Siguiendo la metodología de (Schwann y Neilands, 1987) para la primera solución, se disolvieron 60.5 mg de CAS agar en 50 ml de agua destilada, a esta mezcla se le agregó 10 ml de una solución de Hierro formada por 1 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM HCl y se procedió a agitar. En otro frasco, se diluyeron 72.9 mg de HDTMA (Hexadecyltrimethylammonium bromide) en 40 ml de agua. Se mezclaron ambas soluciones y se pasó a la autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Para la segunda solución, en 900 ml de agua, se mezclaron 15 g de agar, 30.24 g de Pipes (Ethanésulfonic acid) y 12 g de una solución al 50% (peso/peso) de NaOH hasta alcanzar un pH de 6.8. Esto se llevó a la autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Luego se mezclaron ambas soluciones y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta el momento de su uso (Shin et al., 2001).

### 2.2.2 Medición de la reacción CAS

Para el análisis cualitativo se observó el crecimiento de las cepas, y se verificó la reacción CAS mediante el avance en el cambio de color del agar Cromoazurol S, iniciando a partir de la línea borde entre los dos medios. Se tomaron mediciones al 5to, 10mo y 15vo día. La estimación cuantitativa del sideróforo se realizó tomando el sobrenadante de cultivos bacterianos cultivados en medio TSA. (Hu y Xu, 2011). Se tomaron tres repeticiones para cada cepa (Arora y Verma, 2017). Después de la incubación a 28°C durante 48 horas, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos, para ello se tomó 1 ml de caldo y se colocó en un tubo de centrífuga de 1.5 ml (uno para cada cultivo bacteriano) se desecharon los sedimentos celulares y el sobrenadante se utilizó para estimar el sideróforo. El flotante (0.5ml) de cada cultivo bacteriano se mezcló con 0.5 ml reactivo CAS., y después de 20 min, se tomó la densidad óptica a 630 nm (Espectrofotómetro: Thermo Scientific, Evolution®). El sideróforo producido por las cepas, se midió en unidad porcentual de sideróforo (psu) que se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula (Payne, 1993):

$$\begin{aligned} &\text{Producción de sideróforos:} \\ &(\text{Ar} - \text{As}) \times 100 \end{aligned}$$

Donde Ar = absorbancia de referencia (solución CAS y sin inocular caldo), y As = absorbancia de la muestra (CAS solución y sobrenadante libre de células de la muestra).

### 2.2.3 Producción de ácido indolacético (AIA)

Esta prueba se realiza con el objetivo de encontrar cepas eficientes en la producción de la fitohormona. (Lara et al., 2011).

### 2.2.3.1 Curva patrón de AIA

La curva patrón se realizó a partir de diferentes concentraciones de ácido indol acético (Sigma®). Para esto se seleccionaron patrones de: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, y 60 µg/ml. A cada uno se le adicionó 2 ml del reactivo de Salkowski, y se determinó la absorbancia a 530 nm. Se utilizó agua destilada como blanco sin adición del reactivo, las lecturas se hicieron por triplicado y se construyó una gráfica de absorbancia (530 nm) vs. concentración.

**Tabla 1.** Soluciones para curva patrón

<b>Soluciones patrón (µg/mL)</b>	<b>AIA en metanol µL</b>	<b>Agua destilada µL</b>
0	0	1000
1	10	990
5	50	950
10	100	900
15	150	850
20	200	800
30	300	700
40	400	600
60	600	400

Después del periodo de incubación, se procedió a tomar 1,3 ml de cada solución bacteriana y se colocó en tubos de 1,5 ml (Eppendorf®) para su centrifugación a 12,000 rpm por 5 minutos. Se retiró 1 ml del sobrenadante y se mezcló con 2 mL del reactivo de Salkowski. Se agitó por inversión e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurridos los 30 minutos, se tomó la lectura en el espectrofotómetro a 530 nm. La cantidad de AIA cuantificada se comparó con una curva estándar de AIA, preparada previamente. Las lecturas se realizaron a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. A partir de los datos de absorbancia, se determinó la concentración de AIA producida (Mantilla, 2007).

### 2.3 Curva de crecimiento

Para la determinación de la curva de crecimiento en medio líquido (Ashby y TSA) de los aislados bacterianos, se colocaron las cepas 24 (*Lysinibacillus fusiformis*) y la 59 (*Bacillus cereus*) en un agitador orbital por 24 horas a temperatura de 25 °C, posteriormente, (tomándose lecturas cada 30 minutos).

### 2.4 Identificación Molecular

Para la extracción de ADN se utilizó un Kit de extracción NucleoSpin®, cuyo protocolo se describe a continuación:

Se utilizó aproximadamente 40 mg de pellet de cultivo celular microbiano de peso húmedo como material de muestra. Se agregó 100 µL Elution Buffer BE para resuspender las células.

Se transfirió la suspensión celular al NucleoSpin® Bead Tube Tipo B. Se añadió 40 µL Buffer MG. Luego, se agregó 10 µL de proteinasa K líquida.

Se centrifugó el NucleoSpin® Bead Tube 30 s en 11.000 x g.

Se añadió 600 µL Buffer MG y se centrifugó por 30 s a 11.000 xg

Se transfirió el sobrenadante (~500–600 µL) a la columna de ADN microbiano de NucleoSpin® colocándolo en un tubo de recolección de 2 ml (provisto). Centrifugamos para 30 s a 11.000 x g. luego desechamos el tubo de recolección con flujo continuo. Colocamos la columna en un tubo de recolección nuevo.

Colocamos el NucleoSpin® columna de ADN microbiano en un tubo libre de nucleasa de 1,5 ml (no proporcionado), y agregamos 100 µL Buffer BE en la columna. Incubamos a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifuga 30 s a 11.000 x g.

#### **2.4.1 Cuantificación de ADN**

Se agregó 2 microlitros de la muestra de ADN en el equipo NANODROP<sup>®</sup>, para la cuantificación del ADN genómico total.

#### **2.4.2 Electroforesis en gel agarosa**

Preparamos un gel agarosa al 1% se pesó un gramo de agarosa disolviéndolo en 100 ml de buffer TAE más SYBR-Safe<sup>®</sup>. Disolvimos la agarosa hasta su polimerización. Colocamos 2 microlitros de muestra de ADN en cada pocillo. El gel se colocó en la cámara de electroforesis y se le aplicó 70 voltios por una hora.

#### **2.4.3 Caracterización Molecular de las cepas bacterianas**

Los microorganismos se aislaron en medios de cultivo selectivos de crecimiento para evaluar la capacidad, fijar nitrógeno en forma asimbióticas, y para su identificación molecular, se utilizará de las regiones 16S RNA ribosomal. Se utilizará un Kit de extracción NucleoSpin<sup>®</sup>. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes cebadores: 9\_F 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1490R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. Las condiciones de PCR corresponden a Bruner *et al.*, 2013. La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo por next generation sequence (NGS) y se usó la base datos Gene Bank.

### **2.5 Etapa II.**

El experimento se realizó bajo condiciones de campo abierto, sembrando 10 semillas de la variedad I- FL 069-18 por macetas (25 cm de alto/20cm de ancho), a los 20 días después de siembra se realizó un raleo (eliminar plantas de arroz manualmente para dejar sólo dos). Se empleó un diseño completo al azar con 13 tratamientos y 5 repeticiones (Tabla 2), en donde se evaluó cinco cepas de bacterias aisladas. Luego seleccionamos dos cepas promisorias.

**Tabla 2.** Identificación de los tratamientos

T1	Testigo absoluto
T2	testigo comercial 1
T3	Testigo comercial 2
T4	Bacteria 18
T5	Bacteria 18 + N
T6	Bacteria 24
T7	Bacteria 24 + N
T8	Bacteria 38
T9	Bacteria 38 +N
T10	Bacteria 52
T11	Bacteria 52 + N
T12	Bacteria 59
T13	Bacteria 59 + N

El testigo comercial 1 (TC) se le aplicó al inicio de la siembra, el testigo comercial 2 (TC 1) fue aplicado fraccionado.

Modelo

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \text{ para } i = 1, \dots, a \text{ } j = 1, \dots, b, k = 1, \dots, n \text{ donde:}$$

—  $\mu$  es el efecto medio global,  $\alpha_i$  es el efecto incremental sobre la media causado por el nivel  $i$  del factor A,  $\beta_j$  el efecto incremental sobre la media causado por el nivel  $j$  del factor B,  $(\alpha\beta)_{ij}$  el efecto incremental sobre la media causado por la interacción del nivel  $i$  del factor A y el nivel  $j$  del factor B,  $\epsilon_{ijk}$  el término de error.

Las variables medidas fueron: germinación, elongación del tallo, iniciación de panícula, días a floración, días a maduración altura de la planta, granos por planta. Se realizó un análisis de varianza y prueba de diferencias de medias.

## 2.6 Etapa III. Localidades

**Localidad 1** Cabuya, Antón, Coclé.

**Localidad 2** El Bajo, Río Hato, Coclé.

La semilla que se utilizó en las dos localidades fue la I-FL-69-18 del idiap, la distancia de siembra fueron de 25 cm x 25 cm en siembra directa a razón de 6 semillas por golpe. Previo a la siembra las bacterias, se inocularán a la semilla en una dilución de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. La unidad experimental fue de cuatro metros cuadrado, el área total del ensayo  $101.50 \text{ m}^2$ . El diseño experimental fue un bloque completo al azar con 6 tratamientos y tres repeticiones (**Tabla 3 y 4**).

**Tabla 3.** Identificación de los tratamientos

T1	Bacillus cereus
T2	Lysinibacillus fusiformis
T3	Bacillus cereus + N
T4	Lysinibacillus fusiformis + N
T5	NITROGENO
T6	TESTIGO ABSOLUTO

### Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $Y_{ij}$  = observación;  $\mu$  = efecto medio;  $T_i$  = efecto del i-ésimo tratamiento;  $B_j$  = el efecto incremental sobre la media causado por el nivel j del bloque B  $\varepsilon_{ijk}$  = error experimental.

**Variables para medir:** Se midió la altura de planta cada 15 días hasta los 90 dds, al momento de la cosecha se tomó los siguientes datos, hijos por planta, número de granos por espiga, peso de granos por espiga (20 plantas de referencias por unidad experimental), peso de granos por planta (unidad experimental 4 m<sup>2</sup>). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un test diferencias de medias (Tukey).

**Tabla 4.** Arreglo topológico del ensayo en campo (Localidades)

Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
T1	T4	T3
T2	T6	T1
T3	T5	T4
T4	T2	T6
T5	T1	T2
T6	T3	T5

### 3.0 Resultados y Discusión

#### 3.1. Análisis Físico-Químico del suelo

El suelo utilizado para los análisis biológicos, físicos y químicos, presentó las siguientes características (Tabla 5). Colocar Discusión.

**Tabla 5.** Resultados de análisis

Parámetro	Contenido
Textura (Arena-Limo-Arcilla %)	88-10-2
pH en Agua (1:2:5)	6.5
Fósforo (mg/kg)	64.0
Potasio (mg/kg)	190.30
Sodio (mg/kg)	38
Calcio (meq/100g)	4.14
Magnesio (cmol/Kg)	1.99
Aluminio (cmol/kg)	0.20
Materia Orgánica (%)	5.95
Hierro (mg/l)	13.10
Cobre (mg/l)	2
Manganeso (mg/kg)	20.40
Zinc (mg/l)	43

En relación con la textura, el suelo se considera franco arenoso por su alto contenido de arena (88%), su pH fue de 6 lo cual se considera un suelo poco ácido. Este valor mientras más

cerca a la neutralidad influye en una mejor producción de  $\text{CO}_2$  y actividad deshidrogenasa (Valdés García et al., 2020).

El porcentaje de materia orgánica (valor medio) se complementa con las aplicaciones de compost (tipo de abono orgánico) aplicado a la producción. En consideración, el alto contenido de potasio (190.30 ppm) presente en la muestra, suplementa en gran medida las necesidades nutricionales por el cultivo a lo largo del ciclo vegetativo sin afectar el desarrollo y crecimiento de este. Se determinó un valor del aluminio bajo (0.20 cmol/kg), este uno de los elementos que se utiliza como indicador de la acidez de un suelo, en este análisis, el resultado nos indica que el suelo es poco ácido. Los valores basados en niveles críticos de microelementos (Manganeso, Zinc, Cobre, Hierro) indican contenidos muy bajos (IDIAP, 2006) cuando el suelo tiene un pH cercano a la neutralidad o alcalino ( $\text{pH} \geq 6.5$ ), la abundancia de iones OH produce la precipitación de compuestos insolubles de hierro, manganeso, cobre y zinc. De esta manera, estos micronutrientes se vuelven no-disponibles para su absorción por las raíces de las plantas (Osorio, 2012).

### **3.2 Actividad Enzimática de la Deshidrogenasa**

Los resultados obtenidos de la respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) realizados en la finca agroecológica de la comunidad Los Torres (Antón) presentaron una tasa promedio de respiración  $57.15 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (cinco réplicas). En relación con la actividad deshidrogenasa la formación de trifetil formazán (TFF) fue de  $77.44 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  (24 horas) a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , valores comparables a los obtenidos por Ramos y Zúñiga, 2008; los cuales son aceptables si tomamos en cuenta el porcentaje de materia orgánica (1%) y el pH de 6,5, sin embargo, son menores para los parámetros normales para un suelo productivo (2%). En relación con la actividad enzimática de la deshidrogenasa, está se relaciona con la tasa de materia orgánica y puede utilizarse para obtener

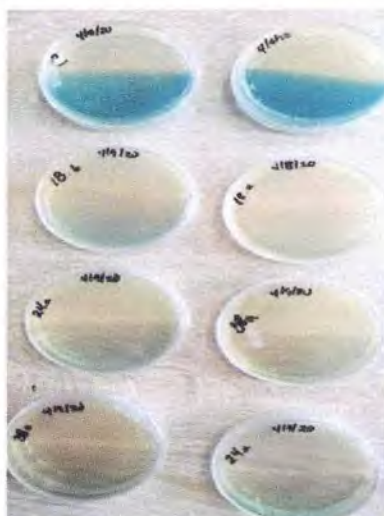
un indicador biológico, como señala la norma de suelos (Panamá) en el Decreto Ejecutivo # 2 de 14 de enero de 2009 y poder establecer la calidad en términos de contaminación o no-contaminación. Las propiedades físicas que pueden ser utilizadas como indicadores de la calidad del suelo son aquellas que reflejan la manera en que este recurso afecta; con la respiración microbiana se puede medir la tasa de intercambio gaseoso entre los microorganismos existente en el suelo, además de que con este parámetro se logra obtener una relación indirecta entre el número de poblaciones de microorganismos y la biomasa microbiana. También la respiración está relacionada con los parámetros fisicoquímicos como el pH y la materia orgánica (Julca-Otiniano et al., 2006). (Figura 3).



**Figura 3.** Comparación de la respiración microbiana en el suelo de la Finca Los Torres, Antón utilizada para el ensayo de macetas (Manejo agroecológico) con un suelo de uso agronómico convencional para el cultivo de arroz (uso de químicos sintéticos). El color rojo (Finca Los Torres, Antón) indica mayor actividad deshidrogenasa (formación de trifeníl formazán).

### 3.3 Producción de Sideróforos

Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas bioquímicas asociadas a la producción de sideróforos tanto cualitativas (figura 4) como cuantitativas.



**Figura 4.** Cepas de transformando el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ . El cambio de coloración de azul a amarillo indicar la formación de sideróros (a 72 horas).

En relación con la cuantificación en la producción de sideróforos (estimación cuantitativa) se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 6). Como se puede observar, se presentó una mayor producción de sideróforos en la cepa 38 (Familia *Bacillaceae*).

**Tabla 6.** Estimación cuantitativa de sideróforos. Medidas en psu (unidad porcentual de sideróforos). Longitud de onda de 630 nm. (Rango normal de valores entre 6 y 70 psu).

CEPA	24 h	48 h	72 h	96 h
18	0.244	0.092	20.00	69.84
24	0.259	0.057	15.08	81.31
38	0.273	0.053	10.49	82.62
52	0.285	0.110	6.56	63.93
59	0.309	0.120	-1.31	60.66

La generación microbiana de fitosideróforos contribuye a mitigar el exceso de compost y metales pesados (Bacilio et al., 2003; de-Bashan et al., 2010). Otra característica importante está relacionada con el control biológico de patógenos de plantas (Romero et al., 2003; Tortora et al., 2011), habilitado por la síntesis de sideróforos generando un mecanismo bioquímico que limita la disponibilidad de hierro (Fe) a los fitopatógenos (Tortora et al., 2011), o causando alteraciones en el metabolismo de la planta huésped, incluyendo la síntesis de una variedad de metabolitos secundarios (elicitores) que aumentan la resistencia de la planta a la infección por patógenos, mecanismo conocido como inducción de resistencia sistémica (ISR) (Sudha y Ravishankar, 2002; Van Loon y Bakker 2005).

#### **3.4 Producción de Ácido Indolacético (AIA)**

Para la producción de ácido indolacético (AIA) se obtuvieron los siguientes resultados, los cuales aparecen en la tabla 7. Se destaca la producción de AIA de las siguientes cepas. El valor más alto (557  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) correspondió a la cepa 59 (*Bacillus cereus*), durante las primeras 24 horas.

**Tabla 7.** Medidas de producción de ácido indolacético para las cepas estudiadas. Se incluyen dos réplicas de las cepas 18, 24, 38, 52 y 59. Valores expresados en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Lectura en 530 nm.

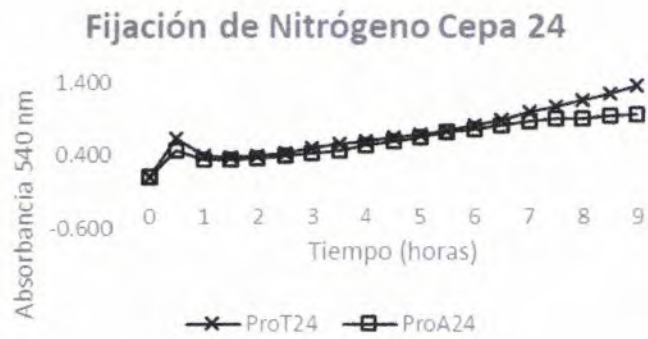
**Lectura a 530 nM 24 hrs**

Muestra	DO 24 hs AIA 24hs		DO 48 hs AIA 48hs		DO 72 hs AIA 72 hs	
18,1	0.171	143	0.298	248	0.474	395
18,2	0.275	229	0.185	154	0.513	428
24,1	0.249	208	0.353	294	0.391	326
24,2	0.229	191	0.326	272	0.192	160
38,1	0.282	235	0.502	418	0.476	397
38,2	0.239	199	0.445	371	0.445	371
52,1	0.218	182	0.262	218	0.343	286
52,2	0.200	167	0.151	126	0.282	235
59,1	0.668	557	0.529	441	0.447	373
59,2	0.331	276	0.287	239	0.238	198

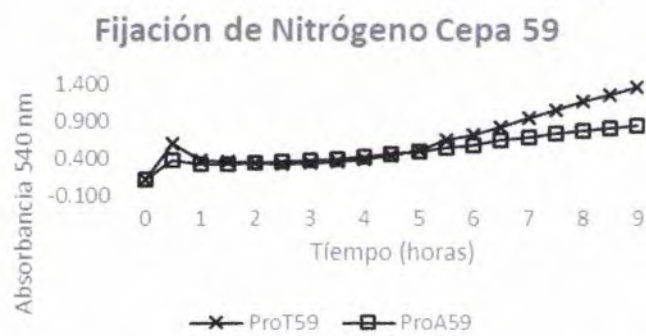
Aunque el beneficio reportado más prevalente de ha sido su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, un número creciente de estudios describen otras propiedades que implican la promoción del crecimiento. Las fitohormonas afectan en gran medida el crecimiento de las raíces, lo que resulta en mejoras en la absorción de humedad y nutrientes (Ardakani y Mafakheri, 2011). Especies como *Bacillus cereus*, reportado como secretor de proteínas y metabolitos eficientes para el manejo de plagas y enfermedades, promueve el crecimiento vegetal a través de la solubilización de fósforo y la producción de reguladores de crecimiento como el ácido indol acético, participa en la fijación de nitrógeno, siendo amigable para el suelo y el ambiente (Ramírez et al., 2016.) Otro género identificado en este estudio fue el *Lysinibacillus fusiformis*, conocido por su capacidad para fijar nitrógeno, producir ácido indolacético y la eliminación de plomo como fitorremediación (Martínez y Dussan, 2017).

### 3.5 Curva de Crecimiento

La cepa 24 (*Lysinibacillus fusiformis*) y la 59 (*Bacillus cereus*) mostraron un mayor crecimiento en medio nutritivo de TSA (Agar Soya Trypticaseína), este aporta nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimidicas, minerales y vitaminas, estos estimulan el crecimiento de diversos microorganismos (CONDALAB; 2021) mientras que el agar Ashby (manitol 20 gr/l, fosfato dipotásico 0.200 gr/L, sulfato de magnesio 0.20gr/L, cloruro de sodio 0.200 gr/L, sulfato de potasio 0.100 gr/L, carbonato de potasio 0.100 gr/L, agar 15.00 gr/L) (SAC, 2023) generó en un menor crecimiento, esto tomando en cuenta que es un medio libre de nitrógeno, selectivo para microorganismos que tengan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Salazar y Ordoñez, 2103).



**Figura 5.** Curva de crecimiento en medio TSA y Ashby *Lysinibacillus fusiformis* (Cepa 24)



**Figura 6.** Curva de crecimiento *Bacillus cereus* (cepa 59).

Por medio de espectrometría, se observa que el crecimiento bacteriano de cada cepa fue diferente (Figura 23 y 24). Se puede apreciar la fase exponencial más larga en medio TSA para el *Bacillus cereus*; mientras que en agar Ashby el comportamiento en la fase exponencial fue mayor en *Lysinibacillus fusiformis*. El género *Bacillus sp.*, se destaca por un rápido crecimiento (Alvarez, 2016).

### 3.6 Identificación Molecular

El ADN genómico total fue extraído mediante el kit NucleoSpin®. La cuantificación de ADN genómico se realizó mediante un NanoDrop® (Espectrofotómetro) (Tabla 8). Para evaluar con precisión la calidad de la muestra, se debe analizar relaciones 260/280 en combinación con la calidad espectral general. Los ácidos nucleicos puros producen típicamente una relación 260/280 ~ de 1.8 y una relación de 260/280 de ~ 2 para ADN y ARN, respectivamente. Esta relación depende del pH y la fuerza iónica del tampón utilizado para realizar las mediciones del blanco y de la muestra. (Desjardins y Conklin, 2010).

**Tabla 8.** Concentración de ácido nucleico de la cepa 24(*Lysinibacillus fusiformis*) y 59(*Bacillus cereus*).

Muestra	Concentración ácido nucleico	A260	A280
24	75.1	1.502	0.818
59	77.2	1.54	0.831

El gen RNAr se amplificó según las siguientes condiciones:

Amplificación del Gen 16S RNAr (Tabla 9).

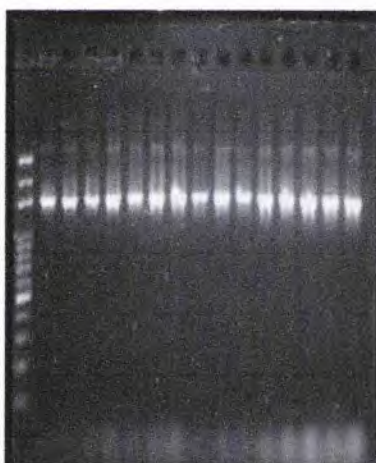
**Tabla 9.** Programa 16s ARNr

Paso	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	10 minutos
35 ciclo PCR	95-55-72	30 seg, 30seg 45 seg.
Extensión final	72	10 minutos
Final	4	

El Gen 16 S RNAr se amplificó bajo las siguientes condiciones:

### 3.6.1 Electroforesis en gel agarosa

El producto de PCR amplificado (1500 pares de bases) fue visualizado mediante una electroforesis en gel agarosa 1.5 %. Finalmente, se realizó la secuenciación del gen 16S RNAr mediante next generation sequence (NGS) amplificándose un fragmento de 1500 pb, usándose la base de datos Gene Bank



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa 1,0%, producto de amplificación de pcr de 1500 pares de bases, usado para la secuenciación del gen 16S RNAr. Marcador de peso molecular Amresco® de 100 a 3000 pb (carril 1 izquierda).

La secuenciación del producto de PCR permitió la identificación a nivel de familia (*Bacillaceae*) (MiSeq®). Posteriormente, para identificar a nivel de especie se secuenció el ADN genómico. Se utilizaron dos estrategias de secuenciación (MiSeq® y MinION®)

**Tabla 10.** Secuenciación

Secuenciador	Protocolo	Ensayo	Cobertura
MiSeq	NEXTERA	200	89%
MinION	SQK-RBK101.96	204	99%

Clasificación de Microbios con GTDB-TK-v1.7.0 (programa para obtener clasificación taxonómica). En este estudio se identificaron dos microorganismos bacterianos (tabla 11).

**Tabla 11.** Resultado de la identificación molecular de las muestras 24 y 59.

Número	Muestra	Clasificación	Referencia
1	24	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NZ_CP010820
2	59	<i>Bacillus cerus</i>	CP028516

### 3.7 Etapa II Siembra en Maceteros

#### 3.7.1 Altura de Planta en el tiempo

Para la variable altura se observó (figura 8), un mayor crecimiento inicial (estado fenológico vegetativo) en los tratamientos donde se inoculó las bacterias con y sin la fertilización nitrogenada, en comparación con el testigo absoluto, mostrando estos microorganismos capacidad de promover el crecimiento en las etapas iniciales en el cultivo

del arroz evaluado bajo estas condiciones. El comportamiento vigor inicial en el desarrollo y crecimiento de la planta de arroz importante para la producción final del cultivo.

Existen bacterias que poseen la capacidad de producir auxinas, citoquininas y giberelinas que influyen directamente en el crecimiento o estimulación de raíces, (Rives, 2007). Estudios reportados del Género *Bacillus sp.* su inoculación a la semilla de arroz favoreció el crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta de arroz, (González, 2017). Estas bacterias promotoras de crecimiento vegetal mostraron su efecto benéfico en la producción en campo, ratificando la importancia de estos microorganismos en los agroecosistemas, (Sierra y Sarmiento, 2008).

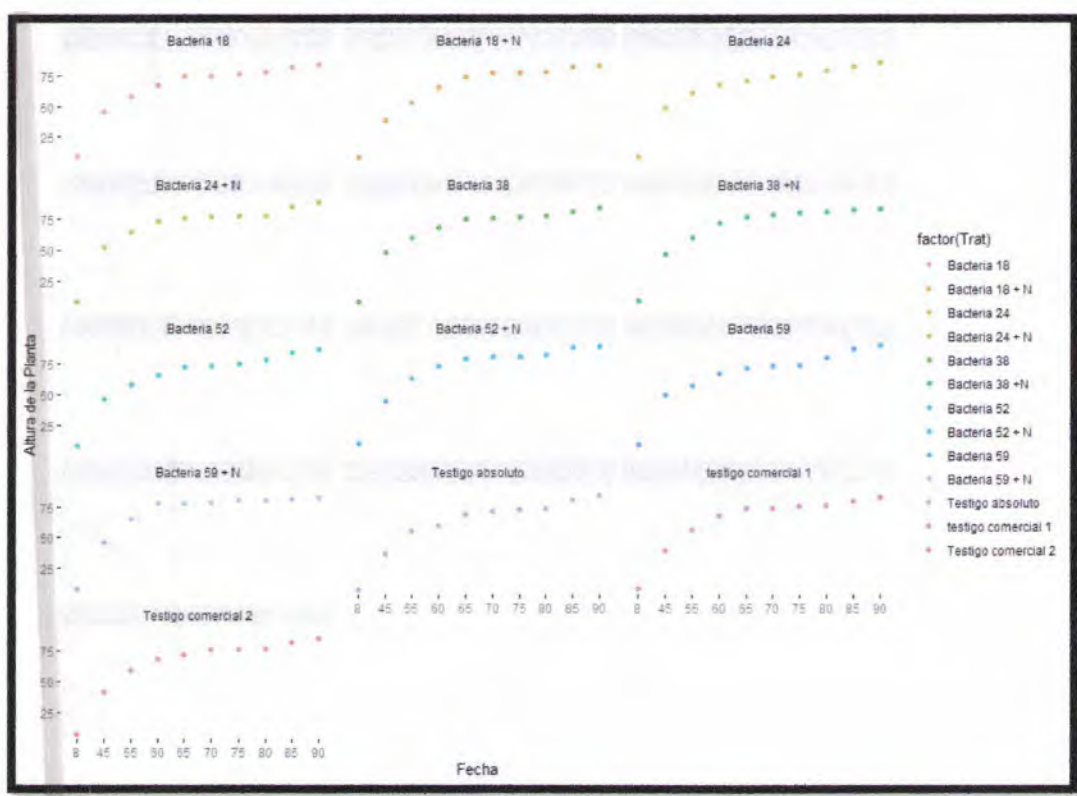


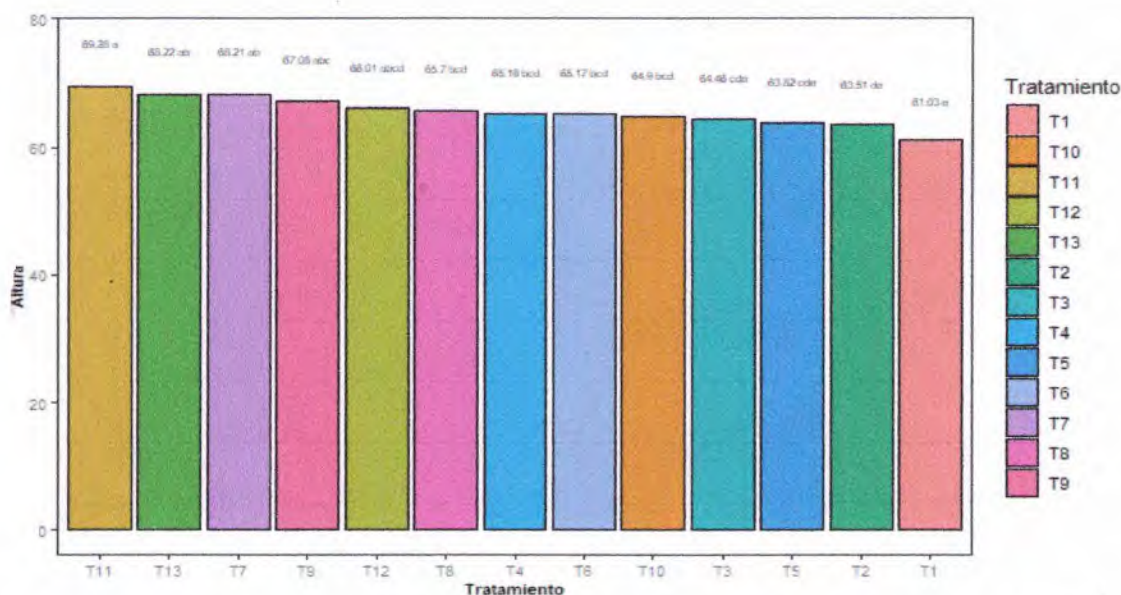
Figura 8. Altura de planta en el tiempo

### 3.7.2 Altura de planta cosecha

En relación con la altura de la planta al momento de la cosecha, se pudo observar diferencias altamente significativas en el efecto de las especies *Bacillus cereus*. y *Lysinibacillus fusiformis* sobre el crecimiento vegetal y sus potencialidades en la promoción de este (tabla 12 y figura 9).

**Tabla 12.** Análisis de varianza

Df	Sum	Sq	Mean	Sq	F value	Pr (> F)
Factor (Fecha)	9	64054	7117	1334.166	2.00E-16	***
factor (Trat)	12	602	50	9.397	3.25E-12	***
Residuals		108	576	5		
Signif. Codes 0 ***						



**Figura 9.** Evaluación de altura de la planta (cm) a los 120 días (etapa fenológica de fructificación). Cepa 52 (T10) cepa 59 (T12), cepa 24 (T6), cepa 38 (T8), cepa 18 (T4), testigo comercial 1 (una sola aplicación de nitrógeno), testigo comercial 2 (aplicación fraccionada de nitrogenada), testigo absoluto (sin bacterias-sin aplicación de nitrógeno). Prueba de comparación de medias por rango  $p < 0,5$ .

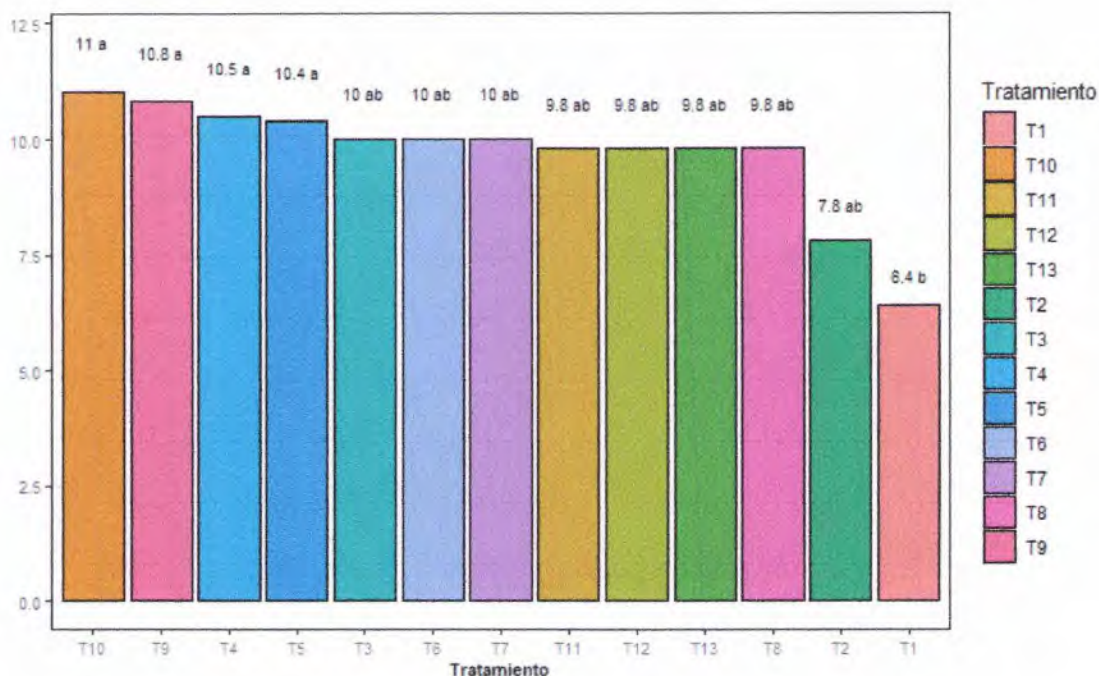
La *Bacillus cereus*, demostró su capacidad como bacteria promotora de crecimiento vegetal en comparación con el testigo absoluto, coincidiendo con estudio previos realizados por (Anaya y Cordero, 2019). El *Lysinibacillus fusiformis* (T6) promovió una mayor altura (68.9 cm) que el testigo absoluto (53.5 cm). El uso del género *Lysinibacillus sp* en plantas de eucalipto aumentó en un 50% su altura en relación con el testigo absoluto en trabajos realizados por Angulo y Sossa (2014).

En relación con la producción de hijos (macollamiento) no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las bacterias; sin embargo, las plantas de arroz inoculadas con bacterias presentaron mayor cantidad de hijos respecto al testigo absoluto (ver tabla 13 y figura 10).

**Tabla 13.** Análisis de varianza (hijos por planta)

Df	Sum	Sq	Mean	Sq	F value	Pr(> F)
Factor Trat	12	94.75	7.89	3.24	1.57E-03	**
Residuals	52	126.7	2.47			
Signif. Codes 0.01 **						

**Nota.** Observamos diferencias altamente significativas para este variable de hijos por planta.



**Figura 10.** El testigo absoluto muestra una cantidad de hijos menor (T1)

Este cultivar posee una alta capacidad de hijos por planta entre 6- 13 (IDIAP, 2019) en el estudio se mantuvo en este rango, los tratamientos con las cepas más nitrógeno resultaron producir de 9.8 a 11 hijos por planta, mientras que el testigo absoluto 6.4 hijos. Destacando una mejor capacidad con el uso de estas cepas en esta variable de medida.

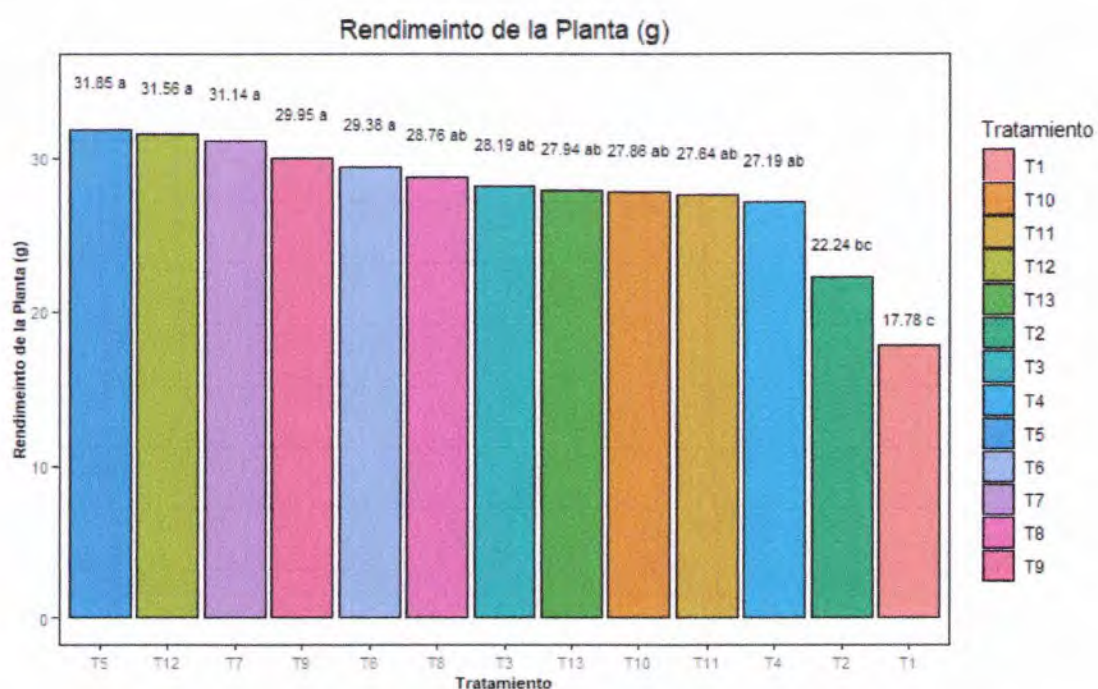
### 3.7.3 Rendimiento en gramos

En cuanto al rendimiento de la planta, los mayores fueron los siguientes: cepa 18+N(T5), *Lysinibacillus fusiformis* nitrógeno (T7), cepa 38+N (T9), *Bacillus cereus* (T12), cepa 24 (T6) y cepa 38 (T8).

**Tabla 14.** Análisis de varianza (Rendimiento en gramos).

Df	Sum	Sq	Mean	Sq	F value	Pr(> F)
factor (Trat)	12	896.3	74.69	8.44	1.45E-08	***
Residuals	52	459.9	8.84			
Signif. Codes 0 ***						

**Nota.** Se observan diferencias estadísticamente significativas en relación con los tratamientos.

**Figura 11.** Rendimiento de los tratamientos con bacterias vs testigo absoluto (T1).

En un estudio realizado por (Zúñiga y Hébert, 2022) *Bacillus sp.* obtuvo el rendimiento más alto en el cultivo de arroz (7.1 tha<sup>-1</sup>). En otro estudio, *A. brasilense* aumentó el crecimiento de *Arabidopsis*, los niveles de prolina, los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, y disminuyó la conductancia estomática y las pérdidas de agua en condiciones de sequía, atributos que se correlacionaron con aumentos en los niveles de ABA (Cohen et al., 2015). Más recientemente,

Curá et al. (2017), demostraron que la inoculación de maíz mejoró la tolerancia de las plantas a la desecación, efectos correlacionados con los contenidos de ABA y etileno. Por lo tanto, el uso de cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, especialmente, es prometedor para la mitigación de los efectos de la sequía.

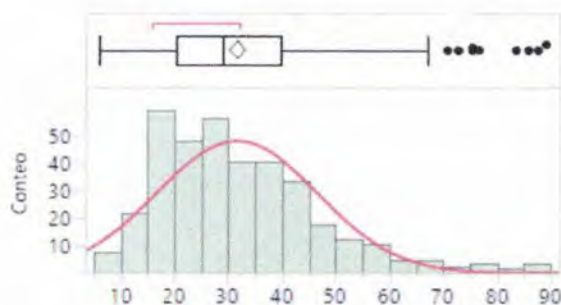
#### 4.0 Etapa III Eficacia Bilógica en Dos Localidades

##### 4.1 Localidad Cabuya

La prueba de Shapiro-Wilk para la eficacia de las bacterias identificadas, indican que los datos tienen igual frecuencia de distribución bajo la campana de Gauss (Figura 12). Por lo que se utilizó pruebas paramétricas para el análisis de los resultados

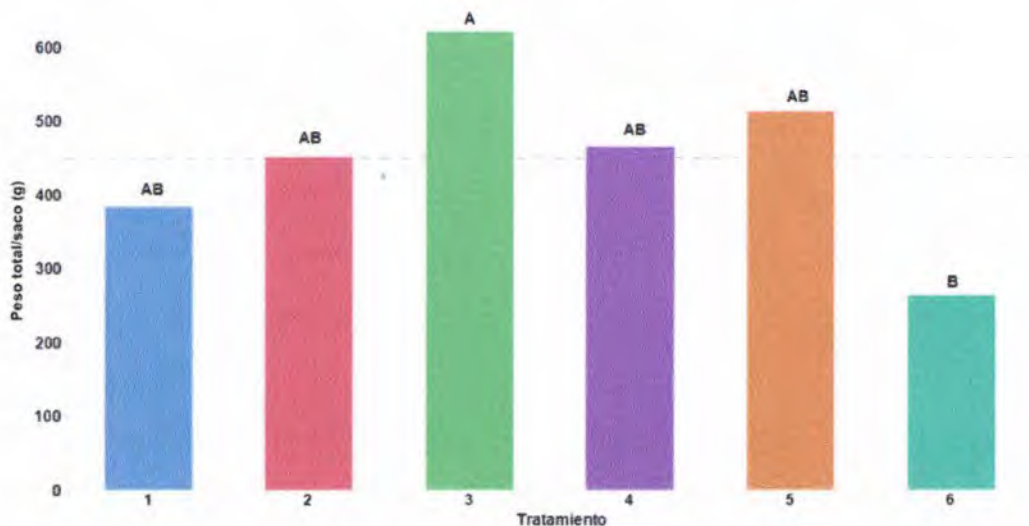
**Tabla 15.** Probabilidad de la Prueba de Shapiro-Wilk.

Prueba W de Shapiro-Wilk	
W	Prob<W
	93.39 <.0001



**Figura 12.** Prueba de Shapiro- Wilk donde muestra la normalidad de los datos.

Se observó que la bacteria *Bacillus cereus* (T3), generó los mayores rendimientos en comparación con el testigo comercial (nitrógeno, T5) y que las dos especies *Bacillus cereus* (T1) y *Lysinibacillus fusiformis* (T2) resultaron con mayor rendimiento que el testigo absoluto (T6) ver (figura 13). Las letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre sí. Estos géneros corroboran los estudios realizados por (Anaya y Cordero, 2019) en donde estos microorganismos poseen capacidad de promover el crecimiento vegetal resultando en un mayor rendimiento.



**Figura 13.** Comparación de rendimientos (g) de los diferentes tratamientos (Cabuya).

Observamos que la altura de planta en el tratamiento 3 que corresponde al *Bacillus cereus* (figura 14), fue mayor que los otros tratamientos, ya que las plantas alcanzaron una altura mayor a 95 cm. La altura de planta es una variable de gran importancia agronómica al momento de la selección de una línea promisorio, los productores toman criterios de evaluación en el uso de variedades enanas o semienanas por su capacidad de macollamiento

y menor susceptibilidad al acame (Bustamante y Méndez, 2010). Plantas tratadas con quitosano presentaron alturas mayores, obteniendo un mayor rendimiento en el cultivo de arroz (Zerpa y Rincón, 2017).

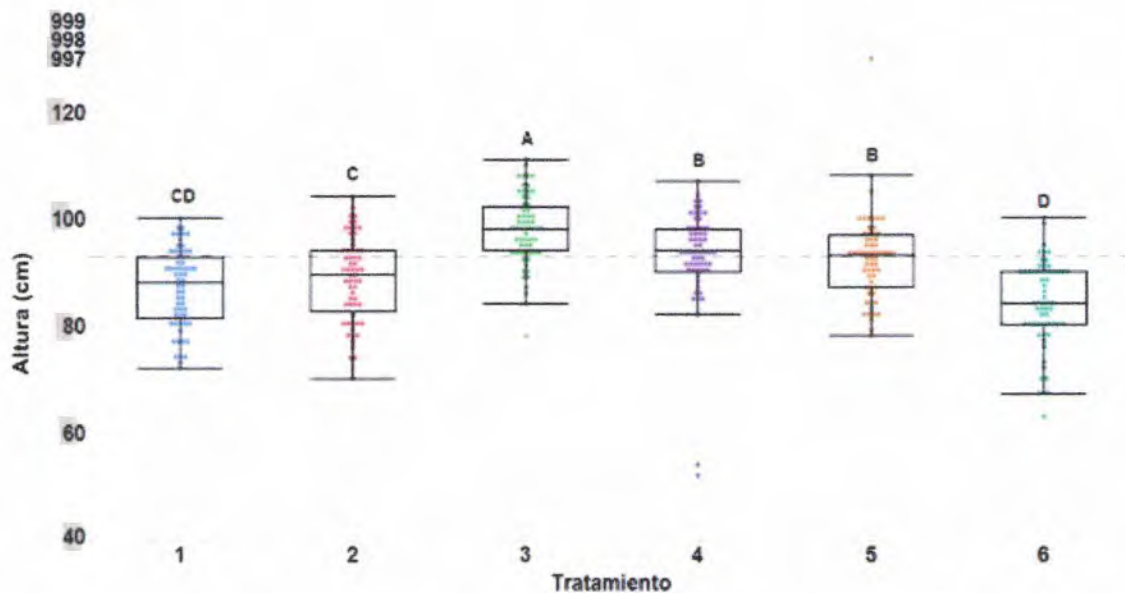
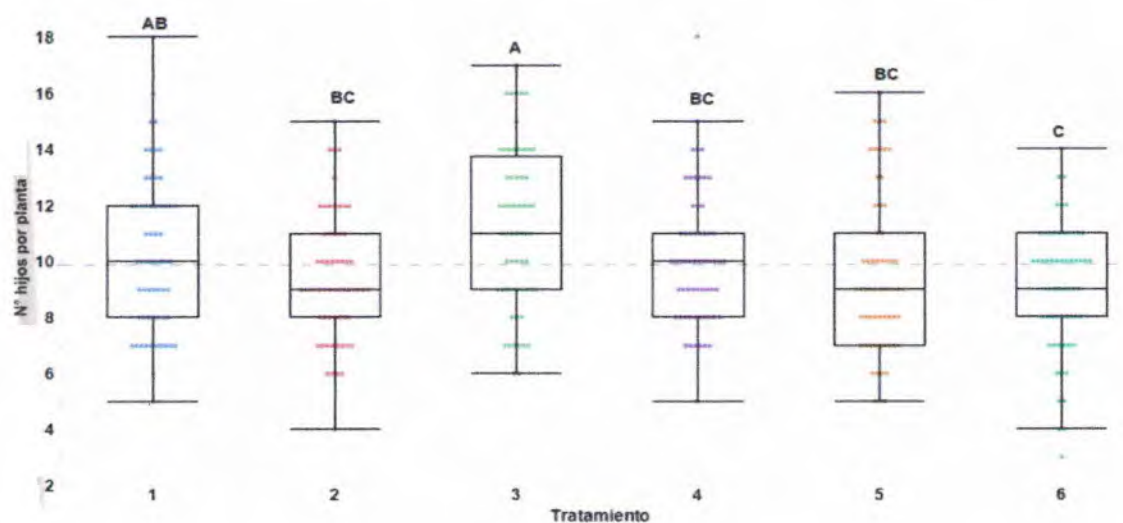


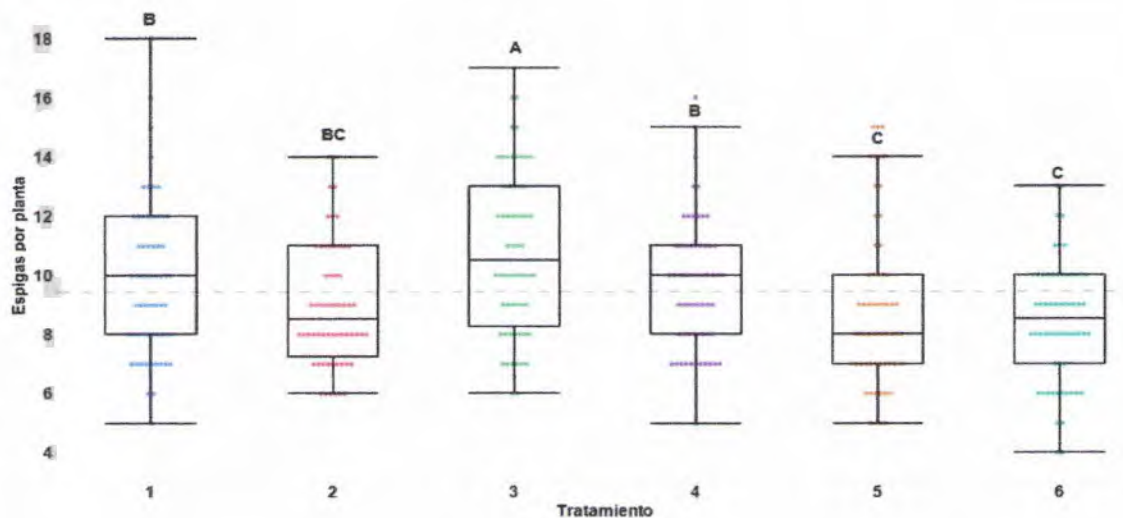
Figura 14. Comparación de altura de planta (Cabuya).

La mayor cantidad de hijos por planta fue la del tratamiento *Bacillus cereus* + Nitrógeno (T3) en comparación con el testigo comercial (nitrógeno), el tratamiento de *Bacillus cereus* (T1) obtuvo mayor número de hijos en relación con el testigo absoluto ver (figura 15). Indicativo de que esta especie colabora en la etapa de macollamiento del arroz dado su potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Anaya y Cordero, 2019).



**Figura 15.** Cantidad de hijos por planta (Cabuya).

La mayor cantidad de espiga por planta se observó en el género *Bacillus cereus* (T3) en comparación con el testigo comercial nitrógeno (T5) ver (Figura 16). Existe en este cultivar una relación entre el número de hijos por planta y la cantidad de espiga, los tratamientos se comportaron de manera similar. El *Bacillus cereus* (T1) presentó mayor cantidad de espiga por planta que el testigo absoluto indicativo de trabajos realizados por (Anaya y Cordero, 2019) en las características que poseen estas bacterias en la promoción en el desarrollo vegetal.



**Figura 16.** Cantidad de espigas por planta (Cabuya)

#### 4.2 Localidad El Bajo

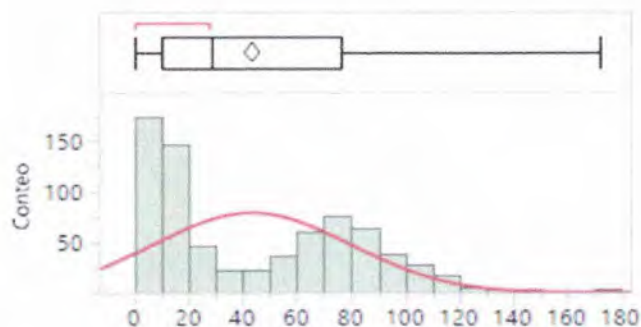
La prueba de Shapiro-Wilk para la eficacia de las bacterias identificadas indican que los datos tienen igual frecuencia de distribución bajo la campana de Gauss (Figura 17). Por lo que se utilizó pruebas paramétricas para el análisis de los resultados.

**Tabla 16.** Probabilidad de la Prueba de Shapiro-Wilk.

Prueba W de Shapiro-Wilk

W                      Prob<W

0.945492 < .0001



**Figura 17.** Prueba de Shapiro- Wilk donde muestra la normalidad de los datos.

Los rendimientos del *Bacillus cereus* +N (T3) y el *Lysinibacillus fusiformis* +N (T4) no presentaron diferencias significativas en comparación con su testigo comercial nitrógeno (T5). De la misma manera estas dos especies en comparación con el testigo absoluto no mostraron diferencias entre si (figura 18). *Bacillus sp* es una bacteria considerada como alternativa ecológica para mejorar el crecimiento del fruto y aumento del rendimiento de los cultivos hortícolas (Palma y Klever, 2021). Estudios realizados en tomates, donde se inocularon bacterias promotoras del crecimiento vegetal, resultaron en un crecimiento vegetativo con tendencias al incremento de la producción y la obtención de mayor número y peso medio de frutos por planta (Saino y Torcuato, 2020).

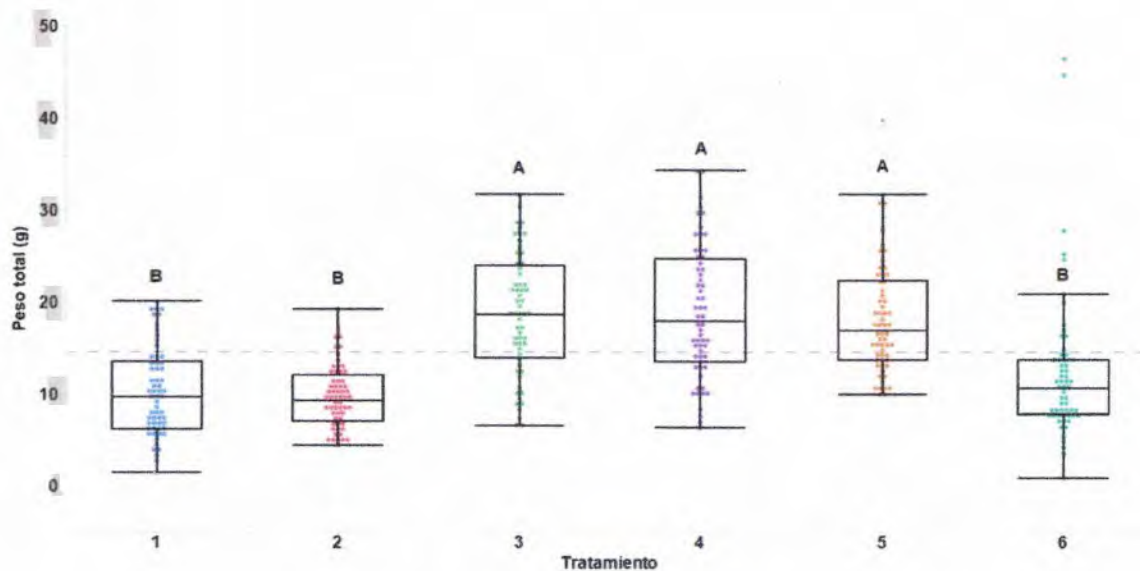


Figura 18. Comparación del rendimiento (El Bajo)

El *Bacillus cereus* + N(T3) y *Lysinibacillus fusiformis* +N(T4) en comparación con el testigo solo nitrógeno (T5) mostraron mayor producción de espiga, Estos dos géneros de bacterias generaron una mayor cantidad de espiga por planta que el testigo absoluto (figura 19).

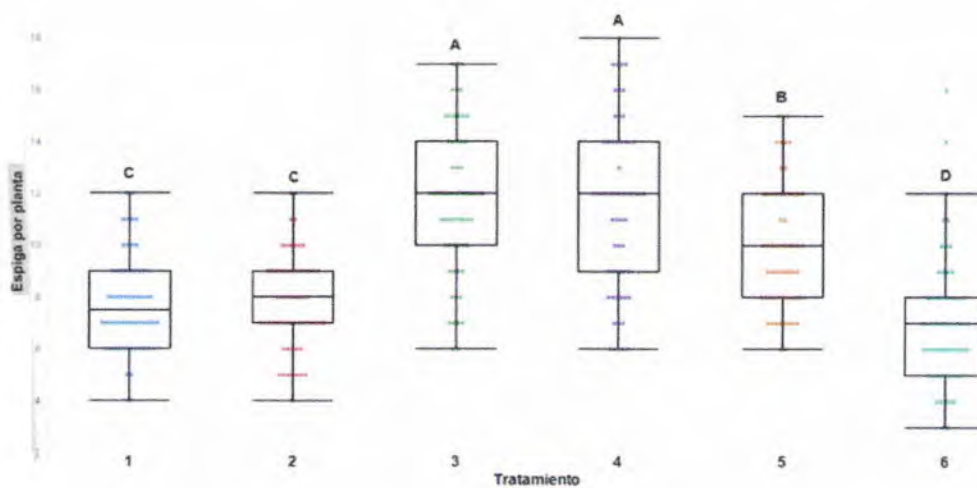
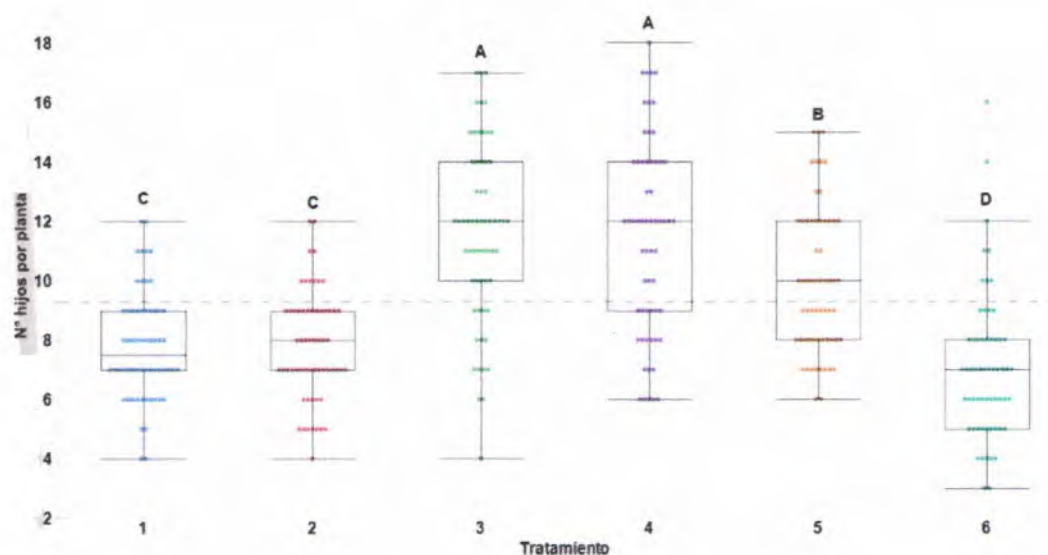


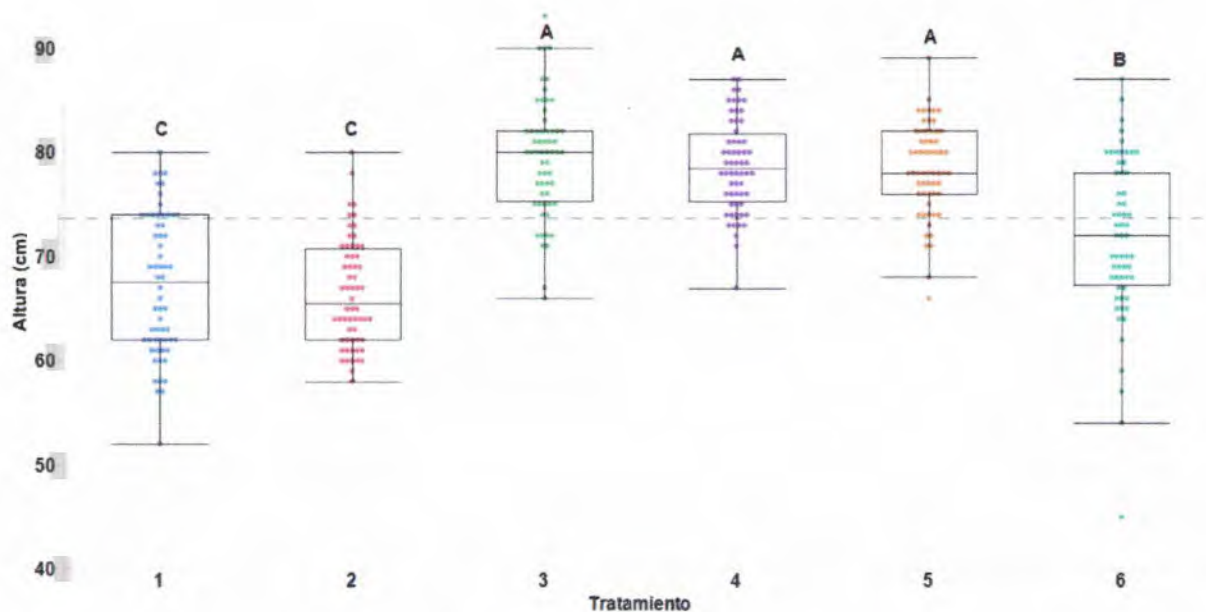
Figura 19. Número de espigas por planta (El Bajo).

El *Bacillus cereus* +N y el *Lysinibacillus fusiformis* +N presentaron mayores números de hijos por planta en comparación con el testigo comercia con nitrógeno (T5). Las cepas de estos dos géneros sólo sin nitrógeno expresaron más hijos que la del testigo absoluto (Figura 20).



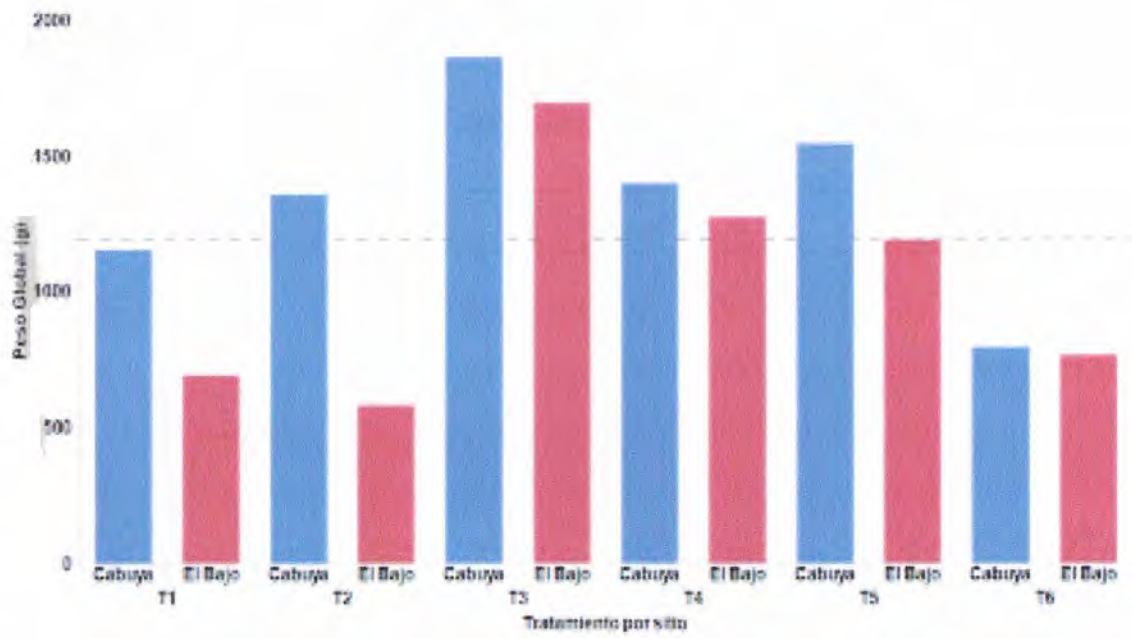
**Figura 20.** Cantidad de hijos por planta (El Bajo)

Observamos que la altura de planta se obtuvo en el tratamiento 3,4 y 5 que (figura 21), La altura de planta es una variable de gran importancia agronómica al momento de la selección de una línea promisoría, los productores toman criterios de evaluación en el uso de variedades enanas o semienanas por su capacidad de macollamiento y menor susceptibilidad al acame (Bustamante y Méndez, 2010). Plantas tratadas con quitosano presentaron alturas mayores, obteniendo un mayor rendimiento en el cultivo de arroz (Zerpa y Rincón, 2017).



**Figura 21.** La altura de planta (El Bajo)

Los mejores rendimientos se obtuvieron en la localidad de Cabuya (figura 22). Resaltamos la consistencia en el comportamiento de los tratamientos en las dos localidades con características edafoclimáticas totalmente diferentes. Cabuya un suelo con alto contenido de materia orgánica (lugar de origen de las bacterias aisladas) versus El Bajo, un suelo arcilloso con bajo contenido de materia orgánica. Los microorganismos en el suelo determinan la disponibilidad de los nutrientes para la planta, algunos de estos son promotores de crecimiento vegetal (Osorio, 2009).



**Figura 22.** Comparativa en las dos localidades del rendimiento siendo el mejor (T3)

## 5. Conclusiones

Se lograron aislar dos microorganismos compatibles con fijadores biológicos de nitrógeno libres, cuyo potencial puede aprovecharse en el estudio de sus capacidades como promotoras de crecimiento vegetal.

El aislado caracterizado 59 (*Bacillus cereus*) y el 24 (*Lysinibacillus fusiformis*) promovió el desarrollo en la altura de la planta y los mejores rendimientos, dinámica propia en la liberación de sustancias que incrementan este desarrollo.

Los rendimientos de las plantas de arroz inoculadas con *Bacillus cereus* y el *Lysinibacillus fusiformis* en la localidad de Cabuya (lugar donde se aislaron) obtuvieron los mejores rendimientos en comparación con la localidad de la finca experimental del Bajo, prueba de que estos microorganismos utilizados del lugar de procedencia son capaces de desarrollar más su capacidad de promover el crecimiento vegetal, en relación a la localidad del Bajo, cuyas características de suelo son totalmente diferentes (convencional).

Este trabajo de investigación aporta al desarrollo de prácticas en la restauración de los suelos a partir de la utilización de microorganismos fijadores de nitrógeno libre.

## 6. Recomendaciones

El uso de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre es una práctica agrícola eficaz y eficiente comprobada en diferentes países de producción agrícola y del trópico, los productores de arroz en Panamá podrían adoptar esta práctica como herramienta de una agricultura sostenible.

Aumentar la inversión en tecnologías enfocada a la producción y masificación de estos microorganismos abre la posibilidad de reducir costos en la producción de arroz en Panamá, debido a encontrar nuevas técnicas que logren a partir de las poblaciones microbianas una producción agrícola sustentable, con la posibilidad de disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados.

Al probar su eficacia y sinergia con el abono nitrogenado (UREA) podrían ser utilizadas en los sistemas productivos de arroz como alternativa viable al uso indiscriminado de estos fertilizantes nitrogenados.

El conocimiento de las metodologías generadas para su aislamiento e identificación, permitirá fortalecer las capacidades en el manejo de estos microorganismos y de su interacción en el cultivo del arroz, creando una línea base prometedora para próximos estudios que se pretendan realizar en otras zonas o en las áreas arroceras de Panamá.

## 7. Referencias bibliográficas

- Adesemoye, A. O., Kloepper, J. W. (2009). Plant-microbes' interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(1),1–12.
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9-21.
- Albuquerque, W. A., Rocha, S. E., Costa, P. V. C., Farias, P. A., Bastos, L. A. (2010). Producción de heliconias Golden Torch influenciada por fertilización mineral y orgánica. *Revista Brasileña de Ingeniería Agrícola y Ambiental*, 14(10), 1052- 1058.
- Álvarez, R. coord. *et al.* 2006. Materia orgánica: valor agronómico en suelos pampeanos. Ed. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.
- Anaya, L., Cordero, A. (2019). *Bacillus cereus*, Bacteria endófito promotora crecimiento vegetal. *Rev. colomb. Biotecnol.* vol.22, n.2, pp.18-23
- Angulo, V., Rodriguez, F., Sossa, K. (2014). Caracterización de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en plantas de eucalipto. *Revista de microbiología* volumen 46, página 338-347.
- Ardakani, M., Mafakheri, S. (2011). Designing a sustainable agroecosystem for wheat (*Triticum aestivum* L.) production. *J Appl Environ Biol Sci* 1:401–413.
- Arora, N. K., Verma, M. (2017). Método de microplaca modificado para la estimación rápida y eficiente del sideróforo producido por bacterias. *Biotech*, 7(6), 381.
- Arshad, M. Frankenberger, W.T. Jr. (1998). Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy*62, 146–151.

- Aznar, A., Chen, N.W.G., Thomine, S., Dellagi, A. (2015). Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Sci.* 240: 90–97.
- Aznar, A., Dellagi, A. (2015). Nuevos conocimientos sobre el papel de los sideróforos como desencadenantes de la inmunidad de las plantas: ¿qué podemos aprender de los animales? *Journal of experimental botany*, 66(11), 3001–3010.
- Bacilio, M., Vásquez, P., Bashan, Y. (2003). Alleviation of noxious effects of cattle ranch composts on wheat seed germination by inoculation with *Azospirillum* spp. *Biol Fertil Soils* 38:261-266
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S., Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil* 249: 271–277
- Badii, M.H., Cuevas, R., Almanza, V.G., Flores, J.L. (2005). Los indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación por agroquímicos en ecosistemas acuáticos y asociados. *CULCyT*, 2(6): 4-17.
- Barrios, E. (2007). Biota del suelo, servicios ecosistémicos y productividad de la tierra. *Ecological Economics*. 64:269-285.
- Bashan, Y., Holguim, G., De Bashan, L. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological molecular agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can Microbiol* 50:52-577.
- Bertsch, P., Howe, Julie., (2003). Localización de cromo en trébol subterráneo mediante espectroscopia. *Ciencia y Tecnología Ambiental* 37 (18), 4091-4097.
- Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabaceas. *IDESIA (ARICA)*. 38(2), 21-29.

- Blanco S., José Orlando. 2003. Manejo integral de suelos con énfasis en el cultivo del arroz. Cúcuta, Colombia.
- Bloemberg, G. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. National Library of medicine (NIH). PUBLMED.
- Bojórquez, S., Jiménez, A., (2010). Fundamentos de la estructura de suelos tropicales. Universidad autónoma de Nayarit.
- Bustamante, V., Méndez, C. (2017). Evaluación agronómica de nueve líneas avanzadas de arroz y dos testigos comerciales bajo condiciones de riego por inundación, Sébaco, Matagalpa. La Calera 17 (29), 51-56.
- Camargo, I., Quiroz, E., Zachrisson, B., (2014). Innovación Tecnológica para el Manejo Intergrado del Cultivo de Arroz en Panamá. p 133.
- Cardona, W. (2017). Factores que intervienen en el proceso de mineralización de nitrógeno cuando son aplicadas orgánica al suelo. Revista colombiana de ciencias hortícolas 11(1). 200-209.
- Carson, K. C., Meyer, J. M., Dilworth, M. J. (2000). Sideróforos de hidroxamato en bacterias de nódulos radiculares. *Soil Biol. Biochem.* 32:11-21
- Casida, L., Klein, D., Santoro, T. (1964). Soil Deshidrogenase Activity. *Soil Science* 98: 371-376.
- Cassman, K. G., Dobermann, A., Walters D. (2002). *Agroecosistemas, eficiencia en el uso del N y manejo del N.* *Ambio.* 31:132-140.
- Castro, R., Cornejo, H., Rodríguez, L., Bucio, J. (2009). El papel de las señales microbianas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. *Plant Signal Behav.* 4(8):701-712.

- Celaya, H., Castellanos, V., (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra latinoamericano* 29(3), 343-356.
- Chaiham, M., Lumyong, S. (2011). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Curr Microbiol.* 62(1):173–181. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9>.
- Chandra, S., Askari, K., Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 581–586.
- Chaparro J., Sheflin A., Manter D., Vivanco J. (2012). Manipulación del microbioma del suelo para aumentar la salud del suelo y la fertilidad de las plantas. *Biol Fertil Soils* 48:489-499.
- Chaparro J., Sheflin A., Manter D., Vivanco J. (2012). Manipulación del microbioma del suelo para aumentar la salud del suelo y la fertilidad de las plantas. *Biol Fertil Soils* 48:489-499.
- Cohen, AC., Bottini, R., Pontin, M., Berli, FJ, Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C., Piccoli, P. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiol Plant* 153:79–90.
- CONDALAB. (2021). Agar soya tripticosina; catálogo 106. Usp/ISO 11133/ISO 11930. Farma copla Europa.
- Curá, A., Franz, D., Filosofía, J., Balestrasse, K., Burgueño, LE. (2017). Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. *Microorganisms* 5:41.
- De Santiago, A., Quintero, J.M., Avilés, M., Delgado, A. (2009). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biol. Biochem.* 41: 2453-2459.

- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., Expert, D. (2009). Los sideróforos microbianos ejercen un papel sutil en *Arabidopsis* durante la infección al manipular la respuesta inmune y el estado del hierro. *Plant Physiol.* 150:1687-1696.
- Desjardins, P., Conklin, D. (2010). Cuantificación de microvolumenes NanoDrop de ácidos nucleicos. JoVE (diarios de experimentos visualizados), e2565.
- Dick y Tabatabai, 1992, Significance and potential use of soil enzymes. En: F.B. Metting (ed), *Soil Microbial Ecology*, Marcel Decker, NY. pp.95-130).
- Dobermann, A., Fairhurst. (2005). Manejo del nitrógeno en arroz (Manual Agronómico). p 1.
- Eisenhauer, N., Bebler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A., Partsch, S., Sabais, A., Scherber, C., Steinbeiss, S., Weigelt, A., Weisser, W., Scheu, S. (2010). Los efectos de la diversidad de plantas en los microorganismos del suelo apoyan la hipótesis singular. *Ecology* 91(2):485-496.
- Eleonora, M., y Pineda, B. (2014). Microbiología del suelo. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu* (Vol. 15, Issue 1).
- Essalmani, H., Lahlou, H., (2003). Mecanismos de bioprotección de plantas de lenteja por *Rhizobium leguminosarum* contra *Fusarium oxysporum* sp. *Lentis. Comp. Rend Biol.* 326:1163-117.
- Garcés, N. (2000). Obtención de sustancias Bioactivas de las plantas a partir de sustancias compostadas. Curso post evento. Facultad de Agronomía. UNAH. 1-8(11): 13- 22.
- González, H., Fuentes, N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal, *Rev.Cientif.* 34.

- González-Guerrero M, Escudero V, Saéz A, Tejada-Jiménez M (2016) Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *Front. Plant Sci.* 7: 1088.
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J., Vera-Nuñez, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261-1274.
- Hassan, D. G., Zargar, M., Beigh, G. M. (1997). Biocontrol de la pudrición de la raíz por *Fusarium* en el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) usando simbióticos *Glomus mosseae* y *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Ecol.* 34:74- 80.
- Hernández, B., Cornejo, H., Mejía, F. 2016. Manual de laboratorio del Curso de Microbiología Ambiental de suelos (Bio. 439). Universidad de Panamá. Panamá.
- Hernández, Y. (1998). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*, 32.
- Instituto colombiano agropecuario (ICA). 2006. Manual de buenas prácticas de distribución y manejo para insumos agropecuarios. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. Bogotá. pp. 12-17.
- Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). 2006. Mapas de Suelo. Laboratorio de suelos Divisa Panamá.
- Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). 2019. Manual de Tecnologías Aplicada en el cultivo de arroz en Panamá.
- Jiménez, Avella; Diego, Javier; 2007; Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* sp.

- Julca-Otiniano, A., Meneses, L., Blas, R., Bello, S. 2006. La materia orgánica, importancia y experiencia de uso en la agricultura. *Idesia* 24.
- Kibblewhite, M., Ritz, K., Swift, M. (2015). Salud del suelo en los sistemas agrícolas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1492):685-701.
- Kloepper, J., Leong, W.J., Teintze, M., Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- Koller, M., Koch, R., Degen, B. (2014). Estrategias de fertilización en plantas ornamentales orgánicas. *Acta Horticulturae*, 1041, 47-52.
- Koshiya, T., Matsuyama, H. (1993). An in vitro system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. *Plant Physiol.* 102: 1319-1324.
- Kucho, K., Hay, A.E., Normand, P. (2010). The determinants of the actinorhizal symbiosis. *Microbes Environ* 25:231-240.
- Lara, C., Oviedo, L., y Betancur, C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 187-194.
- Lara, Cecilia. Mara, Villalba. Zumaqué, Luis. 2007; Bacterias Fijadoras de Nitrógeno de la Zona Agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia.
- López, J., González, R. (2020). Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* sp. Recolectado de frijol. *Terra latinoamericana* 38(4), 841-852.
- Loreto, O. C., López, R. L., Espinoza, V. D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.

- Lozano, L. A. C., Ospina, Y. C. T., (2019 Fundamentos técnicos para la nutrición del cultivo de arroz. FEDEARROZ (Fondo Nacional de Arroz). p 29.
- Lozano, L. A. C., Ospina, Y. C. T., (2019 Fundamentos técnicos para la nutrición del cultivo de arroz. FEDEARROZ (Fondo Nacional de Arroz). p 49.
- Madigan, M., Martinko, J. (2005). Brock Biología de los Microorganismos. *Prentice Hall*. 1152
- Mantilla, M. (2007). Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en periodo de enraizamiento. Tesis Microbiólogo Agrícola. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Marschner, H. (1995) Functions of Mineral Nutrients: Micronutrients. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Edition, Academic Press.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J., Piceno, Y., Desantis, T., Andersen, G., Bakker, P., Raaijmakers, J. (2011). Descifrando el microbioma de la rizosfera para bacterias supresoras de enfermedades. *Science* 332:1097-1100 microbio. *Science* 304:1634-1637.
- MIDA (Ministerio de Desarrollo Agropecuario). (2019). Dirección de Agricultura. Costo de Producción normativo de una ha de arroz mecanizado en secano.
- Milagres, A., Machuca, A., Napoleão, D. (1999). Detección de la producción de sideróforos de varios hongos y bacterias mediante una modificación del ensayo en placa de agar cromo azurol S (CAS). *Revista de métodos microbiológicos*. 37,1-6.

- Morales-García, Y., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J., Contreras, R., Pérez, R., Muñoz-Rojas, J. (2010). Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *BioTecnología*, vol. 14 (2), pp. 11–29.2010.
- Myint, A. K., Yamakawa, T., Kajihara, Y., Zenmyo, T. (2010). Aplicación de diferentes fertilizantes orgánicos y minerales sobre el crecimiento, rendimiento y acumulación de nutrientes del arroz en un arrozal común japonés. *Science World Journal*, 5(2), 47-54.
- Nielsen, M. Bobinado, A. Kroer, N., (2002). Los Microorganismos como Indicadores de la Salud del suelo. *Ciencia medioambiental*.
- Ochardson, E., (2020). El nitrógeno en la agricultura. Centro Internacional de Mejoramiento Maíz y Trigo (CIMMYT).
- Ocon, Z., Herbert, J., (2022). Efecto de bioplaguicidas comerciales a base de bacterias del género *Bacillus* en el cultivo de arroz.
- Okon, Y. Gonzales, Labandera.; 1994; *Agronomic Applications of Azospirillum, Soil Biology and Biochemistry*.
- Osorio, N., (2012). Ph de suelo y disponibilidad de nutrientes. Manejo integral de suelos y nutrición vegetal, vol1 N<sup>o</sup> 4.
- Ozidal, M., Gur, O., Sezen, A., Faruk, O. (2017). Producción continua de ácido indol-3-acético por células inmovilizadas de *Arthrobacter agilis*. *Revista Bio*.
- Palma, M., Klever, J., (2021). Estudio del *Bacillus subtilis* como promotora del crecimiento vegetal en cultivos hortícolas. BABAHOYO: UTP.
- Paredes, M. C. 2013; Fijación Biológica de Nitrógeno en Leguminosas y Gramíneas. Tesis de Ingeniería. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.

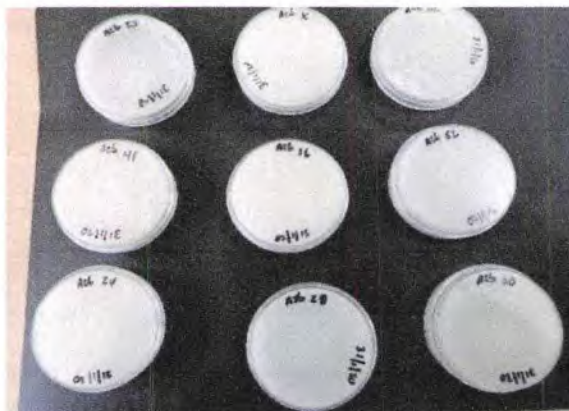
- Parray, J. A., Jan, S., Kamili, A. N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., Ahmad, P. (2016). Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul* 35, 877–902.
- Payne, SM. (1993). Adquisición de hierro en la patogénesis microbiana. *Tendencias Microbiol.* 1:66–69.
- Perrine, F., Rolfe, B. G., Hynes, M., Hocart, C. H. (2004). Análisis de espectrometría de masas por cromatografía de gases de ácido indolacético y triptófano después de la derivatización acuosa con cloroformiato de exudados de *Rhizobium*. *Plant Physiol. Biochem.* 42:723-729.
- Plenchette, C., Dauphin, C.C., Maynard, J.M., Fortin, J.A. (2005). Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Can. J. Plant Sci.* 85:31-40.
- Quiroz, Eveling; Camargo, Ismael; Zachrisson, Bruno; 2014; Innovación Tecnológica para el Manejo Integrado del Cultivo de arroz en Panamá. IDIAP. ISBN 978-9962-677-39-0.
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rivas, G. A., (2019). Aplicación de un enfoque metagenómico al estudio de la diversidad bacteriana asociada a la rizosfera del suelo en la región Bonaerense, Argentina. Departamento de Ciencia y tecnología, Universidad de Quilmes. *Agroalimentario* 23.
- Rives, N., Hernandez, A. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de arroz, perspectiva de uso en Cuba. *Cultivo tropical* vol. 28, p 29-38.
- Rodriguez, Annia. Rodriguez, Narovis. Guerrero, Yanelis. De La Osa, Acela. Perez, Mayra. Divan, Vera. 2014. Potencialidades de las Bacterias Diazotróficas Asociativas en la Promoción del crecimiento vegetal y el Control De *Pyricularia oryzae* en el Cultivo de Arroz. *Rev. Protección Vegetal* vol 29. La Habana, Cuba.

- Rodríguez, H., Fraga, R (1999). Bacterias solubilizadoras de fosfato y su papel en la promoción del crecimiento vegetal. *Biotechnol. Adv.* 17:319-339.
- Romero, AM., Correa, OS., Moccia, S., Rivas, J. (2003). Effect of Azospirillum-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *J Appl Microbiol* 95:832–838.
- Rubio, G. (2002). Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: 19:23.
- Rutherford, P. M., W. B. McGill, J. M. Arocena, and C. T. Figueiredo. 2007. Total nitrogen. pp. 239-250. In: M. R. Carter and E. G. Gregorich, (eds.). *Soil sampling and method of analysis*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Said, M. (2022). *Lysinibacillus: una fábrica biológicos destinada activador bioinsecticida, biocontrol y biorremediación*. Librería Nacional de Medicina.
- Saino, T. (2020). Tesis de grado. Evaluación de bacterias promotora de crecimiento vegetal en tomate.
- Salazar, A, M. Ordoñez. (2013). Aislamiento e Identificación de actomicetos fijadores de nitrógeno en el suelo del jardín botánico de variedades tecnológicas. Trabajo de grado química industrial. 115 p.
- Salazar, J., Aldana, M. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. *BIOtecnia*, 8 (2), 23-28.
- Schwyn, B. y Neilands, J.B., (1987). Ensayo químico universal para la detección y determinación de sideróforos. *Bioquímica analítica*, 160, 47–56.
- Sessitsch J., Howieson, X., Perret, H., Antoun, H., Martínez-Romero, E. (2002). Avances en la investigación de Rhizobium. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21:323-378.

- Sharma, S., Gupta, R., Dugar, G., Srivastava, A. (2012). Impact of application of biofertilizers on soil structure and resident microbial community structure and function. *Bacteria in Agrobiolology: Plant Probiotics*. pp. 65-79.
- Shin, S. H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W., Rhee, J. H. (2001). Ensayo de difusión en agar CAS para la medición de sideróforos en fluidos biológicos. *Revista de métodos microbiológicos.*, 44(1), 89–95.
- Sierra, R., Sarmiento, N. (2008). Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz. *Rev.Colomb. biotecnol* vol. 10 p 1-5.
- Singh, J., Pandey, V. (2011). Microorganismos eficientes del suelo: una nueva dimensión para la agricultura sostenible y el desarrollo ambiental. *Singh Agriculture, Ecosystems and Environment* 140:339-353.
- Sudha, G., y Ravishankar, G. (2002). Involment and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 71:181–212.
- Suquilanda, M. (1996). *Agricultura Orgánica. Alternativa Tecnológica del futuro* UPS FUNDAGRO. Quito, Ecuador.
- Tanwar, S., Shaktawat, M. (2003). Influence of phosphorus sources, levels and solubilizers on yield, quality and nutrient uptake of soybean (*Glycinemax*)-wheat (*Triticum aestivum*) cropping system in southern Rajasthan. *Indian J Agric Sci* 73(1):3–7.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R. (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch Microbiol* 193:275–286.

- Umesh, S., Srikantaiah, M., Prasanna, K. S., Sreeramulu, K. R., Divya, M., & Lakshmi pathi, R. N. (2014). Comparative effect of organics and biofertilizers on growth and yield of maize (*Zea mays. L*). *Curr. Agri. Res. Jour*, 2(1), 55-62.
- Van Loon, LC., Bakker, P. (2005). Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: PGPR: Biocontrol and biofertilization. The Netherlands: Springer, pp 39–66.
- Vandevivere, P., C. Ramírez. (1995). Microorganismos y nutrientes en abonos orgánicos: Bioensayo microbiano para determinar los nutrientes disponibles en abonos orgánicos. *Boletín Técnico de la Estación Experimental Fabio Baudrit M.* 28(2). P90-96.
- Winkelmann, G. (2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society transactions*.
- Young, I., Crawford, J. (2004). Interacciones y Autoorganización en el Complejo Suelo-
- Zerpa., J. A., Rincón., M. C., Rincón., D., Vargas., J. (2017). Efecto del uso de quitosano en el mejoramiento del cultivo del arroz (*Oryza sativa L.* variedad sd20a). p 151-165.
- Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M.S., Dowd. S.E., Paré, P.W. (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency inducible mechanisms. *Plant J.* 58: 568-577.
- Zuberer, D. (1998). Biological Dinitrogen Fixation: Introduction and Nonsymbiotic. Applications of soil microbiology. In *Biological Dinitrogen Fixation: Introduction and Nonsymbiotic*. New Jersey: Prentice Hall

**Anexos**

**Anexo 1.** Crecimiento de cepas en medio Ashby**Figura 23.** Crecimiento de cepas en medio Ashby**Figura 24.** Cepas en crecimiento en medio Ashby

**Anexo 2. Germinación y Crecimiento IDIAP-FL 069-18**



**Figura 25. Germinación IDIAP-FL 069-18**



**Figura 26. Medición altura de Planta.**

### Anexo 3. Crecimiento de plantas en macetas



**Figura 27.** Crecimiento en macetas.



**Figura 28.** Etapa II del experimento. Prueba en macetas.

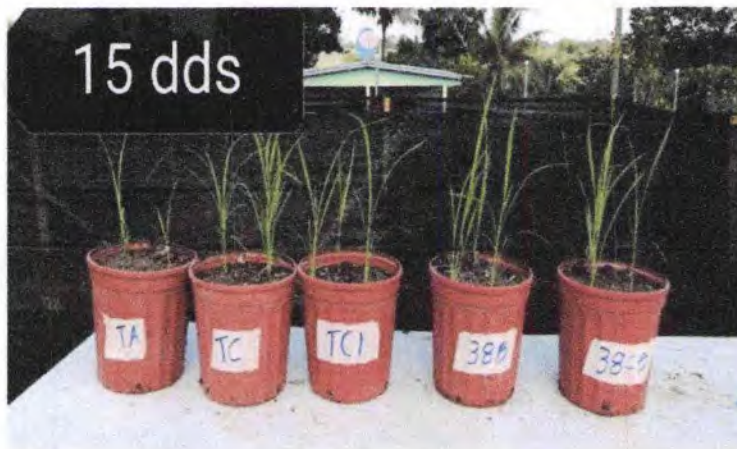
#### Anexo 4. Lecturas del peso en gramos



Figura 29. Toma de dato cosecha. Peso en gramos



Figura 30. Lecturas peso de espiga por planta (*Bacillus cereus*)

**Anexo 5. Crecimiento a los 15 días después de siembra****Figura 31. Crecimiento de las plantas a los 15dds.****Figura 32. Crecimiento de raíces del testigo y las cepas evaluadas.**

**Anexo 6. Localidades. Cabuya- El Bajo****Figura 33.** Localidad de El Bajo, Río Hato.**Figura 34.** Localidad de Cabuya, Río Hato Norte.