

## Artículo Original

# Evaluación para la producción de *Azotobacter sp.* promotor de crecimiento para cultivos de *Coffea arabica*

## Evaluation for the production of *Azotobacter sp.* growth promoter for *Coffea arabica* crops

Jesus Zavala <sup>1</sup>, Mario Alcarraz <sup>2</sup>, Jean Julian <sup>1</sup>

Recibido: 02/03/2020 Aceptado: 10/06/2020 Publicado: 31/08/2020

### RESUMEN

Los biofertilizantes son microorganismos que aumentan la productividad y sanidad de los cultivos, ayudan a fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, producción de sideróforos y fitohormonas. Existe una gran población de microorganismos que ayudan a fertilizar los suelos, entre ellos el género *Azotobacter*. La presente investigación tuvo como objetivo la evaluación de parámetros para una producción potencial de *Azotobacter sp.* a gran escala. Se procesaron un total de 15 muestras de suelos provenientes de la provincia de Rioja, región de San Martín, Perú, para el aislamiento de bacterias del género *Azotobacter* y se midieron las capacidades de fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas e índice de solubilización de fosfatos. La mejor cepa promotora de crecimiento fue cultivada en condiciones batch para evaluar los parámetros de producción. Se aislaron 18 cepas correspondientes al género *Azotobacter* de las cuales las cepas 1I y 1F resultaron con mejores promedios para la fijación de nitrógeno con 2.0496 mgL<sup>-1</sup>, 1.428 mgL<sup>-1</sup> respectivamente, la cepa 1F mejor productora de fitohormona logrando 54.972 mgL<sup>-1</sup>, seguida de la cepa 1G con 52.526 mgL<sup>-1</sup>, el mayor índice de solubilización de fosfatos fue de 3.0 correspondiente a la cepa 1F. Se concluye que la mejor cepa promotora de crecimiento es la F1 y los parámetros optimizados para la producción a escala corresponden a 120 RPM, pH 7, a 30 °C y 1VVM donde se logra una mayor velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) en comparación con las otras combinaciones de variables.

**Palabras clave:** Biofertilizantes; *Azotobacter*; Solubilización de fosfatos; Acido indol acético.

### SUMMARY

Biofertilizers are microorganisms that enhance the productivity and health of crops, help nitrogen fixation, solubilize phosphates, produce siderophores and phytohormones. There is a large community of microorganisms that help fertilize the soil, one of them being the genus *Azotobacter*. The aim of the present research is the evaluation of parameters for potential production of *Azotobacter sp.* on a large scale. 15 soil samples from the Rioja province in San Martin, Peru, were processed for *Azotobacter* isolation and nitrogen fixing capacity, phytohormone production and phosphate solubilization index were measured. The best growth promoting strain was cultured in batch conditions to evaluate production parameters. Out of the 18 *Azotobacter* strains isolated, 1I and 1F showed the best results for nitrogen fixation with 2.0496 mgL<sup>-1</sup>, 1.428 mgL<sup>-1</sup>, respectively; the 1F strain had the highest phytohormone production with 54.972 mgL<sup>-1</sup>, followed by 1G strain with 52.526 mgL<sup>-1</sup>; the highest phosphate solubilization index was shown by 1F strain with 3.0. It was concluded that the best growth promoting strain was 1F and the optimized parameters for scaling production were 120 RPM agitation, pH 7, 30 °C and 1VVM were the highest specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) was achieved, compared to the other variable combinations.

**Keywords:** Biofertilizers; *Azotobacter*; Solubilization of phosphates; Indoleacetic acid.

<sup>1</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Bioprocesos industriales. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Bioprocesos industriales. Lima, Perú.

Autor para correspondencia: [malcarrazc@unmsm.edu.pe](mailto:malcarrazc@unmsm.edu.pe) ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5262-2969>. Dirección: Av. Venezuela C/34.

### Citar como:

Zavala, J., Alcarraz, M. y Julian, J. (2020). Evaluación para la producción de *Azotobacter sp.* promotor de crecimiento para cultivos de *Coffea arabica*. Ciencia e Investigación 2020 23(1):45-50. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/ci.v23i1.18751>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercia\_Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

## INTRODUCCION

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos, cultivos que no se adecuan a determinados suelos, manejo inadecuado de suelos, etc., han provocado una progresiva pérdida o desbalance de los elementos químicos<sup>1</sup>.

Los fertilizantes químicos ayudan a restituir los nutrientes removidos del suelo por las plantas durante su proceso de desarrollo, el fertilizante químico más conocido es el amoníaco el cual debe mantenerse en las cantidades y proporciones adecuadas<sup>2</sup>. Los biofertilizantes son productos biotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes que aumentan la productividad y sanidad de los cultivos, ayudan a fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, fosfatos insolubles, fitohormonas<sup>3</sup>.

Los microorganismos que juegan un rol importante en este proceso natural de fijación de nitrógeno son las bacterias del género *Azotobacter spp*, las cuales tienen una capacidad sobresaliente de fijación de nitrógeno y son denominadas biofertilizantes porque pueden ayudar a mitigar los efectos de la falta de nitrógeno mejorando así la calidad de las cosechas, regenerando de manera gradual la disponibilidad de nitrógeno orgánico en los suelos<sup>4</sup>; pero debido a la carencia de materia orgánica en los suelos hace que su población no sea muy abundante y esto se convierte en un limitante para utilizarlo a escala, por lo que es menester hacer cultivos en el laboratorio para su posterior uso en el campo<sup>5</sup>.

En el presente trabajo se investigó la presencia de bacterias nativas del género *Azotobacter*, a partir de suelos cafetaleros, con capacidades promotoras de crecimiento, para luego seleccionar la mejor y determinar los principales parámetros que permitan su mejor crecimiento a nivel de biorreactor por cultivo batch.

## METODOLOGÍA

### Muestreo:

Las muestras fueron colectadas de acuerdo con la metodología propuesta por Flores<sup>6</sup> en la provincia de Rioja perteneciente al Departamento de San Martín, se recolectaron suelos próximos a la rizósfera de las plantas de café, a 20 cm de profundidad. Para el efecto se segmentó una hectárea de terreno en 20 cuadrantes en cada una de las cuales se recogieron las muestras siguiendo un patrón en zig-zag. Cada muestra de aproximadamente 100 g fue recogida y almacenadas en bolsas ziploc estériles para evitar contaminación con material orgánico foráneo y se conservaron en cajas de tecnopor a 2-5 °C con la ayuda de gel packs para su inmediato transporte y procesamiento en laboratorio.

### 1. Aislamiento de microorganismos

#### a. Aislamiento

Las muestras de suelo fueron tamizadas y enriquecidas en caldo Winogradsky a 30 °C en incubadora con agitación continua (150 rpm) por 92 h. Inmediatamente finalizado el tiempo de incubación, se procedió a diluir

1 mL de la muestra enriquecida en un tubo con 9 mL de solución salina (0.98 % de NaCl), constituyendo ésta la dilución 10<sup>-1</sup>, se continuó diluyendo en serie hasta 10<sup>-7</sup>. Las 3 últimas diluciones 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> se sembraron por diseminación, con ayuda de las espátulas de Drigalsky, en Agar Ashby un medio sólido libre de nitrógeno (Manitol 20.0 gL<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 gL<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 gL<sup>-1</sup>, NaCl 0.2 gL<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 gL<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub> 5.0 gL<sup>-1</sup> y agar 17.0 gL<sup>-1</sup>), las cuales se incubaron a 28 °C por 5 días hasta la obtención de colonias características del género *Azotobacter*, se realizaron réplicas sucesivas en placa con Agar Ashby<sup>7</sup> para verificar la pureza de las colonias seleccionadas y preservarlas en medio sólido Trypticase de soya a 4 °C.

### b. Pruebas bioquímicas

Previamente se describieron y evaluaron las características culturales de las colonias en cuanto a su tamaño, forma, elevación y margen. Luego se realizaron coloraciones Gram y se preseleccionaron las cepas con las siguientes características (colonias grandes, viscosas, bacilos Gram negativos, producción de pigmentos oscuros, motilidad positiva) para las siguientes pruebas bioquímicas<sup>8</sup>: oxidasa, catalasa, ureasa, consumo de carbohidratos: glucosa, manitol, lactosa<sup>7</sup>, presencia de quistes en cultivos viejos y Ashby + benzoato para verificación de pigmentos. Las cepas presuntivas al género *Azotobacter* fueron criopreservadas en medio tripticase de soya semisólido con glicerol como agente crioprotector al 25 % (v/v) a una temperatura de -20 °C.

## 2. Evaluación de las capacidades diazotróficas de las cepas aisladas

### a. Determinación de Fijación biológica de Nitrógeno

Se procedió a la reactivación de las cepas microbianas en caldo tripticase, a 25 °C por 48-72 horas, una vez crecida la cepa se procedió a su inoculación en 20 mL de medio Burk, (MgSO<sub>4</sub> 0.2 gL<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub> 0.005 gL<sup>-1</sup>, KPO<sub>4</sub> 0.2 gL<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 gL<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.00024 gL<sup>-1</sup>, glucosa 5 gL<sup>-1</sup>, ClCa<sub>2</sub> gL<sup>-1</sup>) y se incubó a 28 °C por 72 horas a 120 rpm.

Una vez terminado el período de incubación, se procedió a añadir los reactivos reveladores según la metodología de Lara<sup>9</sup>, para ello se centrifugó el medio Burk a 2500 rpm por 20 minutos recuperando 10 mL del sobrenadante, al que se adicionó 5 mL KCl 2M, dejando reposar por 1 hora. Culminado el tiempo se tomaron 5 mL del reposado y se añadieron los siguientes reactivos en el siguiente orden: solución alcohólica de fenol al 10 % (0.4 mL), nitroprusiato de sodio al 0.5 % (0.4 mL) y solución oxidante compuesta por hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio y citrato de sodio (2 mL). Se agitó y dejó en reposo por 1 hora para luego leer en el espectrofotómetro UV/visible a 632.9 nm utilizando un software MetaSpecPro<sup>8</sup>. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### b. Determinación de producción de ácido indol acético

Luego de la reactivación de las cepas microbianas en caldo tripticasa, a 25 °C por 48-72 horas, se inocularon en 20 ml de caldo triptófano (peptona de caseína 5.0 gL<sup>-1</sup>, NaCl 5.0 gL<sup>-1</sup>, extracto de levadura 3.0 gL<sup>-1</sup>, extracto de carne 1.0 gL<sup>-1</sup> y L-triptófano 2.0 gL<sup>-1</sup>), incubándose a 28 °C por 72 horas a 120 rpm<sup>10</sup>.

Para el análisis colorimétrico, se procedió a centrifugar el caldo triptófano a 3000 rpm por 10 minutos recuperando el sobrenadante, posteriormente se separó 1 mL del sobrenadante y se agregó 1 mL del reactivo de Salkowski (cloruro férrico y ácido sulfúrico 18M<sup>11</sup>) dejando en reposo por 30 minutos en cámara oscura. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 530nm en un espectrofotómetro UV/visible, utilizando el software MetaSpecPro. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### c. Determinación de la solubilización de fosfatos

Las cepas se sembraron en caldos de tripticasa para su reactivación, a 25 °C por 48-72 horas; posteriormente según Carrillo<sup>12</sup>, se sembraron en agar Sundara Rao Sinha (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 gL<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 gL<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 gL<sup>-1</sup>, CaSO<sub>4</sub> 0.1 gL<sup>-1</sup>, MoO<sub>3</sub> 0.001 gL<sup>-1</sup>, Sacarosa 5.0 gL<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04, Agar 15 gL<sup>-1</sup> y púrpura de Bromotimol 0.5 gL<sup>-1</sup>) mediante la técnica de moteado. Se consideró positivo para la solubilización el cambio de color del indicador púrpura a amarillo y la formación de un halo translúcido alrededor de la colonia después de una incubación a 28 °C por 4 días<sup>11</sup>. Los ensayos se realizaron por triplicado. Finalmente, se calculó el índice de solubilización mediante la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{D}{d}$$

D: diámetro de la colonia + halo

d: diámetro de la colonia

Las colonias que evidenciaron halos amarillos, fueron probadas en medio Pikovskaya (Extracto de levadura 0.5 gL<sup>-1</sup>, Dextrosa 10 gL<sup>-1</sup>, CaSO<sub>4</sub> 5 gL<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 gL<sup>-1</sup>, KCl 0.2 gL<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.1 gL<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.0001 gL<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.0001 gL<sup>-1</sup>, Agar 15 gL<sup>-1</sup>), considerando como positivos la presencia de halos translúcidos alrededor de la colonia, para evidenciar la solubilización de fosfato.

### 3. Evaluación de variables para el proceso de producción de biomasa

La cepa con mejores características de promoción de crecimiento vegetal fue cultivada en el biorreactor Biosstat A (Sartorius) y se analizaron las siguientes variables que influyen en el crecimiento microbiano: pH, agitación, temperatura (tabla 1)

Se trabajó con un volumen de 1.0 L en medio caldo tripticasa de soya con un inóculo de 3x10<sup>8</sup> UFCmL<sup>-1</sup>. La evaluación de los parámetros se realizó en función de la biomasa generada, para lo cual se evaluó la cinética de

crecimiento microbiano. Una vez inoculado y homogenizado el medio se determinó la biomasa inicial, para lo cual se tomó 2 mL de muestra, se centrifugó a 2500 rpm y se realizó, por dos veces, un lavado celular con solución salina 0.85 %. Esta muestra fue utilizada para determinar la biomasa inicial, correspondiente al tiempo cero, mediante espectrofotometría a 600 nm en un espectrofotómetro UV Visible Modelo UV – VIS 5200. El procedimiento se repitió cada dos horas hasta completar las 30 horas programadas para cada combinación de las variables programadas (tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros establecidos para la producción del género *Azotobacter*.

PARÁMETROS		30 °C	28 °C
AGITACIÓN	80 rpm	pH 7	a*
		pH 6	c*
	120 rpm	pH 7	e*
		pH 6	g*

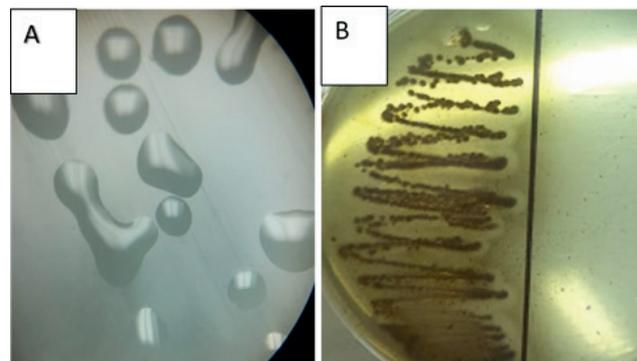
\*a, b, c, d, e, f, g, h, i: indica la  $\mu_{max}$  por cada cinética bajo los parámetros establecidos.

Se aplicaron análisis estadísticos como análisis de superficie de respuesta, análisis ANOVA con un  $\alpha=0.05$  y diseño factorial a través de un paquete estadístico Infostat.

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento de microorganismos

Se recuperaron un total de 24 cepas en los medios Ashby y Winogradsky, de los cuales 18 representaron un 67 % de los aislados presuntivos para el género *Azotobacter*.



**Figura 1. A:** Macrocolonias de *Azotobacter sp* en medio Ashby, vista desde estereoscopio 8X. **B:** Producción de pigmentos de *Azotobacter sp*. En Agar Ashby con benzoato.

### 2. Evaluación de las capacidades diazotróficas de las cepas aisladas

#### a. Determinación de Fijación biológica de Nitrógeno

Se determinaron las concentraciones fijadas de nitrógeno atmosférico, midiendo la concentración de amonio (NH<sub>3</sub>) por el método de Berthelot que van desde 0.93 mgL<sup>-1</sup> hasta 2.7 mgL<sup>-1</sup>, previamente se determinó la curva patrón a partir de concentraciones de CINH<sub>4</sub> para extrapolar las absorbancias medidas en el ensayo, donde se registraron valores de R<sup>2</sup> de 0.9893.

**Tabla 2.** Valores de nitrógeno fijado de las cinco mejores cepas de *Azotobacter sp*

Código de cepa	Nitrógeno fijado NH <sub>3</sub> mgL <sup>-1</sup>
1I	2.0496
1F	1.428
1G	1.3189
2D	1.0689
1E	0.9322

b. Determinación de producción de ácido indol acético

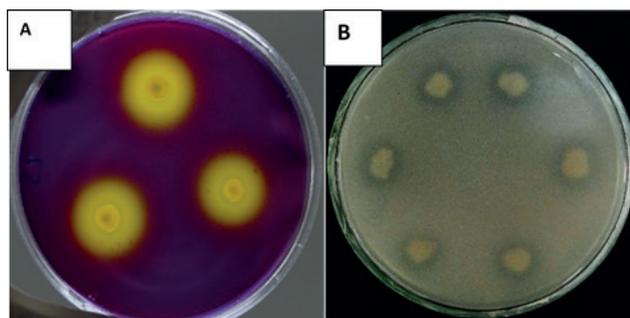
La producción de fitohormonas, específicamente ácido indol acético, realizadas por las cepas aisladas presuntivas a *Azotobacter sp* fue desde 15.013 a 57.829 mgL<sup>-1</sup>, teniendo una curva patrón cuya una ecuación de la recta fue  $Y = 0.0551X + 0.0134$  extrapolando las absorbancias obtenidas (tabla 3).

**Tabla 3.** valores de ácido indol acético producido por las cinco mejores cepas de *Azotobacter sp*.

Código de cepa	Ácido indol acético mgL <sup>-1</sup>
1G	52.526
1F	54.972
1E	23.688
2G	25.1
2F	15.43

c. Determinación de la solubilización de fosfatos

Los halos de solubilización en los medios SRSM muestran índices de solubilización de hasta un valor de 3.

**Figura 2.** Valores máximos de índices de solubilización en medio SRSM de 5 cepas seleccionadas.**Figura 3.** A: Medio SRSM de la cepa 1F. B: Medio Pikovskaya de la cepa 2D, evidenciando halos de solubilización de fosfatos.

3. Evaluación de las variables para el proceso de producción de biomasa

La evaluación de crecimiento de la cepa 1F en el biorreactor, utilizando las diversas combinaciones de variables programadas en la tabla 1, se realizó a través de la generación de biomasa, velocidad de crecimiento; resultado de la interpretación de la cinética de crecimiento para cada combinación. Los dos mejores resultados están representados en la gráfica 4 y 5.

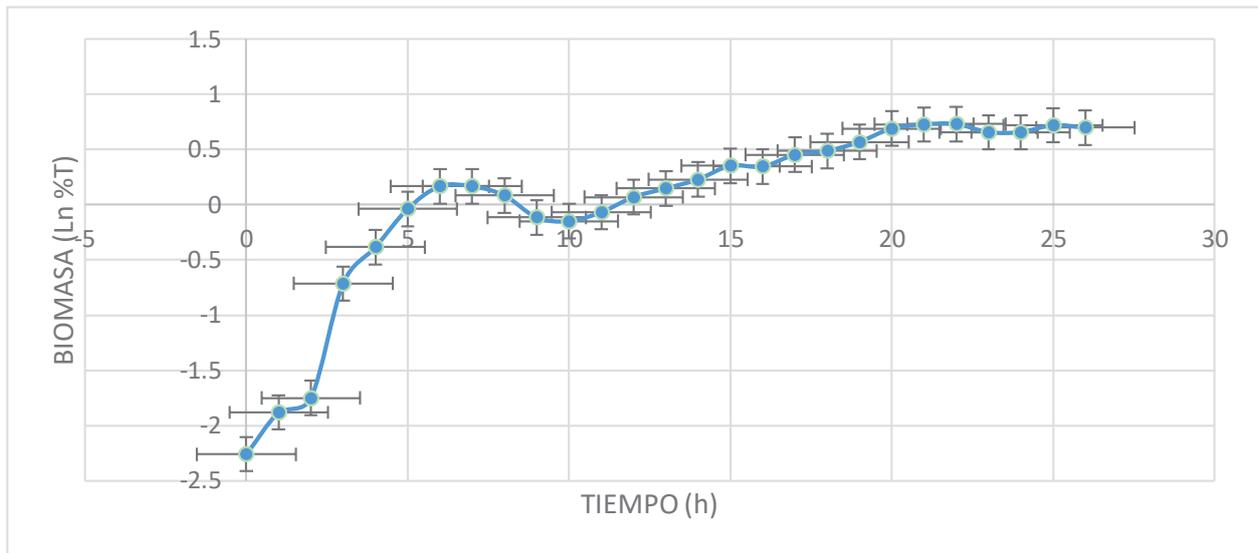
**Tabla 4.** Velocidad de crecimiento de las respectivas cinéticas de crecimiento de la cepa 1F, cultivado en bach a las diferentes combinaciones de parámetros.

Cinética	$\mu_{max}$
a	0.1064 h <sup>-1</sup>
b	0.0946 h <sup>-1</sup>
c	0.0823 h <sup>-1</sup>
d	0.0623 h <sup>-1</sup>
e	0.1503 h <sup>-1</sup>
f	0.1214 h <sup>-1</sup>
g	0.0937 h <sup>-1</sup>
h	0.0745 h <sup>-1</sup>

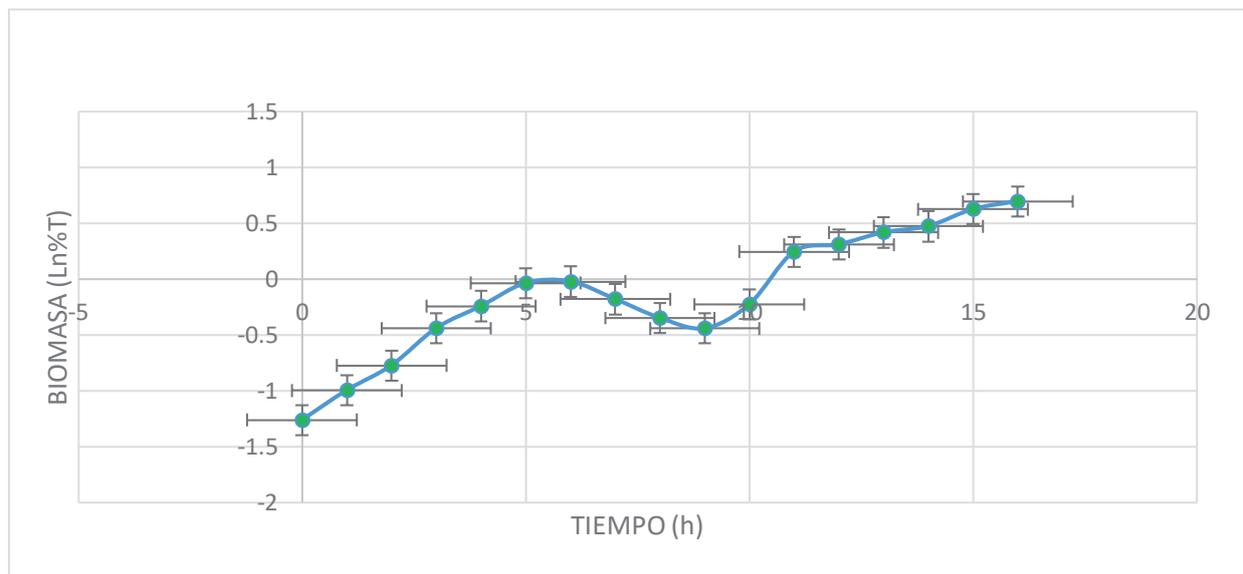
## DISCUSIÓN

El género *Azotobacter*, al ser un microorganismo fijador de nitrógeno atmosférico, presenta potencial como fertilizante natural de los suelos. Comparando las características morfológicas, se lograron aislar 24 cepas acorde en tamaño, forma, elevación y margen, las pruebas bioquímicas evidenciaron presunción del 67 % para identificación del género *Azotobacter* según Bergey's<sup>13</sup>.

Los valores de fijación de nitrógeno (ver tabla 2) son comparados con los expuestos por Escobar et al.<sup>14</sup>, donde el aislamiento de cepas identificadas como *Azotobacter* alcanzan valores de hasta 1.64 mgL<sup>-1</sup> de amonio producido, otros autores como Lara et al.<sup>9</sup> reportan valores de nitrógeno fijado en forma de amonio (NH<sub>4</sub>) de hasta 5.1743 mgL<sup>-1</sup>. También, se evidenció que la concentración de ácido indol acético producido por estos microorganismos es considerado alta (ver tabla 3), Clavijo et al.<sup>15</sup> reportan valores de producción de ácido indol acético de bacterias de la rizósfera en un rango de 2.42 hasta 46.47 µgmL<sup>-1</sup>, mientras que Escobar et al.<sup>14</sup> encuentran que sus cepas aisladas del género *Azotobacter* sintetiza valores de 7.10 hasta 57.99 mgL<sup>-1</sup>. Por otro lado, la biodisponibilidad de fosfatos es un factor muy importante en la fertilización de suelos, los índices de solubilización del género *Azotobacter* demuestran la capacidad que tiene este microorganismo para aportar de ortofosfatos a los suelos de cultivo, Kumar et al.<sup>16</sup> utilizando medio Pikovskaya reportaron índices de solubilización de hasta 2.3 por *Azotobacter chroococcum mutants*, los índices de solubilización reportados en la presente investigación en el medio SMRS son valores de 0.33 hasta valores de 3 (figura 2).



**Figura 4.** Cinética de crecimiento "e" de la cepa 1F, con parámetros 120 rpm, pH 7, 30 °C y 1VVM de aireación. El máximo de biomasa se alcanza a las 7 horas con una velocidad de crecimiento de 0,1503 h<sup>-1</sup>. Fuente: elaboración propia



**Figura 5.** Cinética de crecimiento "f" de la cepa 1F, con parámetros 120 rpm, pH 7, 28 °C y 1VVM de aireación. La biomasa generada es menor a "e" al igual que la cinética de crecimiento 0.1214 h<sup>-1</sup>. Fuente: elaboración propia.

Respecto a la evaluación de parámetros para la producción de biomasa, los resultados encontrados en esta investigación (figura 4-5) evidenciaron claramente que los parámetros como temperatura, pH y agitación son determinantes en el crecimiento de especies como *Azotobacter* (cepa 1F). La variación de la temperatura, aunque sea mínima, aumentará la velocidad de crecimiento debido a que también aumenta la reacción catalizada por enzimas<sup>17</sup>. De acuerdo a los resultados de la cinética de crecimiento (figuras 4 y 5) se nota claramente que a 30 °C de temperatura se logra la mayor velocidad de crecimiento 0,1503 h<sup>-1</sup> para la cepa seleccionada (cepa 1F) y la culminación de la fase exponencial, por tanto de cosecha, a las 7 horas de cultivo a nivel de laboratorio; a diferencia del proceso a 28 °C donde la velocidad de crecimiento es menor 0.1214 h<sup>-1</sup> y la generación de biomasa es menor. En este caso una comparación entre 28 °C y 30 °C

permitió determinar la temperatura óptima a 30 °C al igual que Dhanasekar et al.<sup>18</sup> utilizando como fuente de carbono glucosa y optimizando parámetros de pH (7.5) y temperatura (30 °C), obtuvieron valores de  $\mu_{\max}$  0.091 h<sup>-1</sup> y Mukhtar et al.<sup>19</sup> quienes obtuvieron resultados similares con los parámetros óptimos de 30 °C y un pH de 7 obteniendo valores máximos de biomasa de 0.75 mgmL<sup>-1</sup>. En cuanto al pH, el valor óptimo de 7 con el que se trabajó en esta investigación presenta similitud con lo obtenido por Mukhtar<sup>19</sup>, donde a pesar de que trabajaron con diferentes géneros de *Azotobacter* todas crecieron óptimamente a pH neutro. Algunas investigaciones indican diferentes valores de pH que van desde 6.8<sup>20</sup> hasta 7.5<sup>17</sup>. Por último, la variación en la agitación se encontró valores similares a los reportados para la cepa 1F. Especies como *Azotobacter chroococcum* reportado por Galal & Ouda<sup>20</sup> pueden lograr una mayor cantidad de biomasa a

170 rpm, Camelo<sup>21</sup> comprobó que elevando el nivel de aireación se obtiene mayor biomasa al igual que Peña<sup>22</sup>, el cual indica que especies como *Azotobacter* debido a sus específicas necesidades metabólicas tienen un estrecho rango óptimo de crecimiento eficiente.

## CONCLUSIONES

Se concluye que la mejor cepa nativa promotora de crecimiento vegetal, aislado de suelos cafetaleros, es la cepa 1F y los parámetros que permiten su mejor crecimiento a nivel biorreactor y cultivo batch corresponden a 120 rpm de agitación, 7 de pH, a una temperatura de 30 °C y 1 VVM de aireación. por lo tanto, se le considera potencialmente promotor de crecimiento para el cultivo de *Coffea arabica*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tejera N, Lluch C, Martínez-Toledo M, Gonzales J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant Soil*. 2005; 270(1): 223–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1522-7>
- Aguado G, Moreno B. Introducción al Uso y manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. En Aguado A. Biofertilizantes Bacterianos Desarrollados por el INIFAP/SAGARPA. Mexico. 2008; 2(1): 151-170.
- Hamzaoui L, Zahaf M. The organic Food Market: Opportunities & Challenges. En Reed M. Organic Food and Agriculture, Intech Open, Croacia. 2012; 1(4):1-28. DOI: 10.5772/30155.
- Sethi S, Adhikary S. Cost effective pilot scale production of biofertilizer using *Rhizobium* and *Azotobacter*. *Afric Jour of Biotech*. 2012; 11(1):70.
- Alatorre R, Raymundo A, Miranda L, Ramírez S, Villanueva C, Jarquín I. Biofertilizantes: La solución a la productividad en el Campo. En Impactio. Review your worldwide impact in visualized citation map. 1° edición México: Universidad Autónoma Chapingo. Texoco; 2015.
- Florez J, Leal G, Ardila L, & Cárdenas D. (2017). Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Norte de Santander (Colombia). *Agrocienc*. 2017; 51(4): 373-391.
- Malusa E, Pinzari F, Canfora L. Efficacy of Biofertilizers: Challenges to Improve Crop Production. In: Singh D, Singh H, Prabha R. Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity. New Delhi: Springer. 2016. p.17-40 Doi: 10.1007/978-81-322-2644-4\_2
- Garrity M, Brenner D, Krieg N, Staley J, Boone D, De Vos P. The Proteobacteria, Part B: The Gamma proteobacteria. In: Springer. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Estados Unidos. 2004. 2(2).
- Lara C, Villalba M, Oviedo Z, Eliécer L. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. *Rev Col de Biotec*. 2007; 9(2): 6-14. ISSN 1909-8758.
- Torres M, Valencia S, Bernal J, Martínez P. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Rev Latin de Microbio*. 2000; 42(4): 171-76.
- Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria, *Appl and enviro microbio*. 1995; 61(2): 793–796.
- Carrillo A, Puente M, Bashan Y. Aplicaciones biotecnológicas en ecología microbiana – Manual de laboratorio. Pontificia Universidad Javierana, Departamento de Biología y Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur. México. 1996.
- Bergey D. & Holt G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Nine edition. Baltimore: Williams & Wilkins. Philadelphia; USA. 1994. p.787.
- Escobar C, Horna Y, Carreño C, Mendoza G. Characterization of native strains of *Azotobacter* spp. And its effect on growth of *Lycopersicon sculentum* Mill. "tomato" in Lambayeque. *Scien Agro*. 2011; 2(1): 39 – 49.
- Clavijo C, Chipana V, Centeno J, Zúñiga D, Guillén C. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú. *Eco Apl*. 2012; 11(2): 89-102.
- Kumar V, Narula N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol and Fert of Soils*. 1999; 28 (3): 301-305.
- Prescott L, Harley J, Klein D. *Microbiology*. 4 th edd. Pp. 198-200. McGraw-Hill. Boston. 1999.
- Dhanasekar R, Viruthagiri T, Sabarathinam P. Poly (3-hydroxy butyrate) Synthesis from a Mutant Strain *Azotobacter vinelandii* Utilizing Glucose in a Batch Reactor. *Bioche Eng Jour*. 2003; 16 (1): 1-8.
- Mukhtar H, Bashir H, Nawaz A. Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer. *J Bacteriol Mycol*. 2018; 6(5): 274-278.
- Galal G, Ouda S. Production of alginate by different isolates of *Azotobacter* species. *Life Sci*. J. 2014; 11(9): 29-38.
- Camelo M. Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica *Azotobacter chroococcum*. [Tesis maestría] Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada. 2010.
- Peña C, Trujillo R, Galindo E. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii* [small star, filled]. *Enz and Microbial Tech*. 2000; 27(1):390-398.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

**Fuente de financiamiento:** Autofinanciado.