

AISLADOS BACTERIANOS CON POTENCIAL BIOFERTILIZANTE PARA PLÁNTULAS DE TOMATE

Bacterial Isolates with Biofertilizer Potential for Tomato Plantlets

José Noh Medina^{1*}, Carmen Yam Chimal², Lizette Borges Gómez²,
José Juan Zúñiga Aguilar³ y Gregorio Godoy Hernández³

RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron rizobacterias en diversos medios de cultivo y se sembraron en medios selectivos para estudiar su capacidad de solubilización de fosfato y de producción de ácido indolacético (AIA), con el fin de probarlas como promotoras del crecimiento vegetal en plántulas de tomate. Se obtuvieron 83 aislados bacterianos del rizoplano de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), maíz (*Zea mays*) y calabaza (*Cucurbita pepo*), de los cuales 15 sintetizaron AIA con un rango de concentración de 0.17 a 12.51 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 33 solubilizaron fosfato inorgánico. El uso de los aislados KCH3 y TSACH2 inoculados a las semillas de tomate, y que solubilizaron fosfato *in vitro*, incrementaron significativamente la biomasa de la parte aérea de las plántulas de tomate (42 y 32% respectivamente), permitiendo obtener plántulas más vigorosas que las plántulas sin inoculación de rizobacterias. Ambos aislados mostraron potencial para ser utilizados como biofertilizantes en la producción de plántulas de tomate.

Palabras clave: rizobacterias, reguladores del crecimiento, promoción del crecimiento vegetal.

SUMMARY

In this work rhizobacteria were isolated in diverse culture mediums and seeded in selective media to study their capacity to solubilize phosphate and produce indole acetic acid (IAA) to test their use in promoting tomato plantlet growth. Eighty three bacterial strains were

isolated from the rhizoplane of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), maize (*Zea mays*) and squash (*Cucurbita pepo*). Fifteen of these isolates synthesized IAA at concentrations ranging from 0.17 to 12.51 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 33 strains solubilized inorganic phosphate *in vitro*. The isolates KCH3 and TSACH2, which solubilized phosphates *in vitro*, increased shoot biomass of tomato plantlets (42 and 32% respectively); these plantlets were more vigorous than those that were not inoculated. Both rhizobacteria showed potential for use as biofertilizers in the production of tomato plantlets.

Index words: rhizobacteria, growth regulators, plant growth promotion.

INTRODUCCIÓN

La rizósfera constituye un microhábitat donde ocurren numerosas interacciones entre las plantas, que producen una gran cantidad de exudados, y los microorganismos del suelo que pueden ser atraídos o repelidos por la gran variedad de moléculas liberadas por las diversas especies vegetales (Bais *et al.*, 2006). Se estima que del 2 al 5% de las rizobacterias pueden estimular el crecimiento vegetal por medio de diferentes mecanismos (Antoun y Klopper, 2001). En algunos casos, las rizobacterias estimulan directamente el crecimiento mediante la producción de reguladores, como el ácido indol-3-acético (AIA), la isopentenyladenosina (IPA) y el ácido giberélico (Arshad y Frankenberger, 1991; Patten y Glick, 1996; Parvin *et al.*, 2011); otro mecanismo que favorece el crecimiento vegetal es la solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos en el suelo por medio de la producción de fosfatasa y de ácidos orgánicos, que aumentan la disponibilidad del fósforo para las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999; Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; Keneni *et al.*, 2010; Wahyudi *et al.*, 2011). En otros casos, el efecto favorable sobre el crecimiento de las plantas cultivadas es a través de mecanismos indirectos, como las actividades antagonistas de algunas bacterias contra

¹ Instituto Tecnológico de Tizimín. Final Aeropuerto Cupul S/N. 97700 Tizimín, Yucatán, México.

* Autor responsable (jnohmedina@yahoo.com)

² Instituto Tecnológico de Conkal. Km 16.3 antigua Carretera Mérida-Motul. 97345, Conkal, Yucatán, México.

³ Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, A.C. Calle 43 no. 130 Col. Chuburná de Hidalgo. 97200, Mérida, Yucatán, México.

microorganismos fitopatógenos por medio de la producción de antibióticos, enzimas y compuestos volátiles que permiten reducir la incidencia de enfermedades de las plantas cultivadas (Maurhofer *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 2000; Mojica-Marín *et al.*, 2009; Rudrappa *et al.*, 2010). En algunos casos, las bacterias benéficas son capaces de estimular los mecanismos de defensa vegetal, como el reforzamiento de la pared celular y la producción de compuestos fenólicos y fitoalexinas. Algunas bacterias tienen la capacidad de inducir la resistencia sistémica (IRS) de las plantas contra bacterias, hongos y virus fitopatógenos. Este mecanismo se caracteriza en que la bacteria benéfica y el organismo patógeno permanecen separados físicamente, la rizobacteria no causa ningún síntoma visible en la planta, ni tampoco un efecto de toxicidad en el patógeno (Van-Loon *et al.*, 1998). En condiciones de escasa disponibilidad de Fe^{+3} , las bacterias benéficas que producen sideróforos compiten ventajosamente con los microorganismos fitopatógenos por este elemento, reduciendo de este modo la disponibilidad de Fe^{+3} para los microorganismos patógenos y en consecuencia, la incidencia de enfermedades (Leeman *et al.*, 1996; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006). Otro mecanismo por el cual las rizobacterias pueden estimular el crecimiento de las plantas es mediante la actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico desaminasa, que hidroliza el 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), el inmediato precursor del etileno, que reduce la concentración de esta fitohormona y su efecto inhibitorio del crecimiento vegetal (Glick *et al.*, 1998; Sgroy *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Diversos estudios han demostrado que la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal ha logrado mejorar el crecimiento de plántulas de tomate, trigo, soya, maíz y otras especies, mediante la combinación de los mecanismos mencionados anteriormente (Chabot *et al.*, 1996; Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2010).

Los diferentes mecanismos que utilizan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) hacen de estos microorganismos una herramienta interesante que se puede integrar a los diferentes procesos de la producción agrícola, como es la nutrición vegetal y el control de plagas y enfermedades. De esta forma se permite un mejor aprovechamiento de la fertilidad natural de los suelos, reduciendo la aplicación de fertilizantes minerales y pesticidas que contaminan el ambiente. En cuanto

al uso de biofertilizantes, destacan las bacterias del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* las cuales fijan nitrógeno en simbiosis con diversas especies de leguminosas. En diversos países, principalmente en los desarrollados, se aplican habitualmente biofertilizantes a los cultivos, preparados con microorganismos como *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus* y micorrizas. En países de América Latina como México, Colombia, Brasil, Cuba, Venezuela, Nicaragua y Costa Rica existen muchas experiencias a pequeña y mediana escala, en las que se usan diferentes productos que tienen como base de su funcionamiento a microorganismos nativos. En México, algunas instituciones como el INIFAP y SAGARPA tienen diferentes ensayos con cepas potencialmente útiles como biofertilizantes, los cuales ya se utilizan en ciertas explotaciones tecnificadas como la soya en Argentina y Brasil (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012). Un aspecto importante a considerar es que a menudo, las cepas utilizadas como biofertilizantes son introducidas a regiones donde no pueden competir con la microbiota local o no se adaptan a las condiciones del clima y suelo, de ahí la importancia de los trabajos de investigación con microorganismos nativos, adaptados a las condiciones de la región donde se pretendan aplicar (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010). Los objetivos del presente trabajo fueron: i) aislar y purificar bacterias de la rizósfera de plantas de chile habanero, maíz y calabaza cultivadas en la región de Yucatán, y ii) estudiar la capacidad de síntesis del ácido indol-3-acético (AIA) y solubilización de fosfato *in vitro*, con la finalidad de evaluar el efecto de la inoculación de las rizobacterias seleccionadas en el crecimiento de plántulas de tomate.

MATERIALES Y METODOS

Sitio de Estudio

El aislamiento y la caracterización de las capacidades de síntesis del ácido indolacético (AIA) y de la solubilización de fosfato de las rizobacterias se llevaron a cabo en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Las muestras que fueron colectadas para el aislamiento de las rizobacterias provienen de cultivos de chile habanero, maíz y calabaza de la Comisaría de Dzityá, Municipio de Mérida, Yucatán (21° 03' 01" N y 89° 40' 43" O), con una altitud de 7 m. El suelo de origen de las rizobacterias se caracteriza por ser de una textura franco-limosa, pH alcalino (7.96),

alto contenido de materia orgánica (19.05%), buena capacidad de intercambio catiónico (39.38 meq 100 g⁻¹), alto contenido de nitrógeno total (11.26%), fósforo Olsen (22.8 mg kg⁻¹) y potasio intercambiable (656.75 mg kg⁻¹). El agua de riego para el cultivo tuvo un pH alcalino (7.62), conductividad eléctrica de 1.310 mS cm⁻², 199.03 mg L⁻¹ de cloruros, 421.36 mg L⁻¹ de sulfatos, 109.81 mg L⁻¹ de calcio, 48.85 mg L⁻¹ de magnesio y 370 mg L⁻¹ de bicarbonatos.

Aislamiento y Purificación

Para el aislamiento de los microorganismos, se seleccionaron plantas sanas de maíz y calabaza de un mes a partir de la germinación (en etapa de crecimiento), y de chile habanero de tres meses después del trasplante (en etapa de producción); raíces de cada una de las tres especies de plantas fueron sacudidas con vigor dejando únicamente las partículas de suelo fuertemente adheridas, en seguida se tomaron fragmentos de raíces colocándolos en matraces con 100 mL de solución salina estéril al 0.85% (NaCl, J.T. Baker), mismos que fueron agitados a 200 rpm durante 1 h en un agitador orbital New Brunswick Scientific Co., G-25 8885. El aislamiento se realizó mediante diluciones decimales seriadas (de 10⁻¹ a 10⁻⁶) inoculando a los medios de cultivo en cajas de Petri con 100 µL de las diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶. En el aislamiento se emplearon diferentes medios de cultivo para favorecer la diversidad de los microorganismos. Los medios fueron suplementados con 100 µg mL⁻¹ de cycloheximida (SIGMA, Aldrich) para inhibir el crecimiento de hongos. El medio caldo de soya tripticaseína (TSB por sus siglas en inglés, DIBICO) al 10% suplementado con 10 µg mL⁻¹ de penicilina G (SIGMA, Aldrich) o 5 µg mL⁻¹ de Polimixin B (SIGMA Aldrich) se empleó para favorecer el aislamiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas, respectivamente. El agar de soya tripticaseína (TSA por sus siglas en inglés, DIBICO) al 10% se empleó para el aislamiento del género *Bacillus* (Bashan *et al.*, 1993). El medio King B se empleó para estimular el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* y el medio extracto de levadura-tryptona (TY por sus siglas en inglés, SIGMA Aldrich) se empleó para favorecer el aislamiento de *Rhizobium* (Herrera-Cervera *et al.*, 1999). Las rizobacterias obtenidas fueron denominadas de acuerdo al medio de cultivo donde fueron aisladas: TSB PEN (caldo de soya tripticaseína agar + penicilina G) TSB POL (caldo de soya tripticaseína agar + polimixina B),

TSA (agar de soya tripticaseína), TY (extracto de levadura) y K (King B) y del cultivo: CH (chile habanero), M (Maíz) y C (calabaza). Las bacterias purificadas se conservaron a -20 °C en glicerol estéril al 30%. Se realizaron pruebas de tinción Gram a las nueve bacterias aisladas de chile habanero, que se utilizaron en el ensayo de producción de plántulas de tomate, resultando todas Gram negativas con morfología de cocos.

Síntesis de ácido Indolacético

Todas las rizobacterias aisladas fueron sembradas en el medio de cultivo Czapek suplementado con 2.5 mM de L-Triptófano (SIGMA, Aldrich), ajustando el pH a 7.3 ± 0.2 e incubadas a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 72 h manteniéndolo en agitación a 200 rpm. Los cultivos bacterianos de 72 h fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 5 min en una centrifuga Hermle Labortechnik, Z 233 MK. Un mL de sobrenadante se mezcló con un mL de reactivo Salkowski (12 g L⁻¹ de FeCl₂ en 7.9 M de H₂SO₄) y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente en la obscuridad (Glickmann y Dessaux, 1995). La presencia de AIA fue determinada por el desarrollo del color rosa y su cuantificación se realizó mediante un espectrofotómetro de luz ultravioleta Marca Thermo Spectronic modelo Génesis 10 a una longitud de onda de 530 nm con una curva estándar de AIA a concentraciones de 0, 4, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 µg mL⁻¹.

Solubilización de Fosfatos

La prueba de solubilización de fosfato inorgánico fue realizada mediante el método de Mehta y Nautiyal (2001) en el medio líquido NBRIP-Bromofenol azul en el cual la decoloración del tinte azul indicó la solubilización de fosfato inorgánico. El fosfato tricálcico (SIGMA, Aldrich) se utilizó como fuente de fósforo.

Producción de Plántulas de Tomate Inoculadas con Rizobacterias

Este estudio se llevó a cabo en el Instituto Tecnológico de Tizimín, Yuc. Tomando en consideración la capacidad de solubilizar fosfatos y la producción de AIA, se seleccionaron nueve rizobacterias aisladas del cultivo de chile habanero, para estudiar su efecto en la producción de plántulas de otra especie solanácea,

en este caso tomate (semilla híbrida Sun 7705, Nunhem) en invernadero. Las rizobacterias fueron cultivadas durante 24 h en el medio líquido TSB, centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento celular suspendido en solución de NaCl (0.85%) para ser utilizados como inoculante. Antes de la inoculación, las semillas de tomate fueron desinfectadas en su superficie con etanol al 70% durante 2 min y con cloro comercial (Cloralex®) al 50% durante 5 min, aplicando tres enjuagues con agua destilada estéril y se dejaron secar durante 1 h en la campana de flujo laminar. A continuación las semillas se inocularon remojándolas durante 1 h en la suspensión bacteriana. Se utilizaron tres semillas tratadas con cada bacteria, para estimar el número de células inoculadas en cada semilla mediante el método de diluciones decimales seriadas y siembra en cajas de Petri en medio TSA al 10%, resultando un promedio de 3×10^7 UFC por semilla. La siembra se realizó en contenedores de poliestireno de 200 cavidades llenas con sustrato húmedo a base de turba (Sunshine®). Después de la germinación, las plántulas fueron regadas de manera manual agregando al agua de riego 1 g L^{-1} del fertilizante 18-18-18. Las plántulas se colectaron 25 días después de la siembra, evaluando el peso seco de la parte aérea de las plántulas y su altura. El diseño experimental fue completamente al azar, sembrando dos contenedores de 200 cavidades por tratamiento, mismos que fueron rotados de posición dentro del invernadero cada tres días. Se aplicaron 10 tratamientos al cultivo experimental, de los cuales nueve correspondieron a las rizobacterias aisladas de plantas de chile habanero (Cuadro 1) y un testigo sin inocular. Los muestreos se hicieron tomando 20 plantas al azar por tratamiento (10 por cada contenedor). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y la comparación de medias fue por el método de la diferencia mínima significativa (dms), utilizando el programa InfoStat versión 2010 (Di Renzo *et al.*, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y Purificación de las Rizobacterias

Se obtuvieron 83 aislados bacterianos, de los cuales 22 fueron obtenidos de las plantas de chile habanero, 31 de maíz y 30 de calabaza. Del total de aislados, 33 (40%) mostraron capacidad de solubilización de fosfatos (Cuadro 1), y 15 (18%) produjeron diferentes concentraciones de AIA (Figura 1). Trabajos previos

han mostrado proporciones variables de bacterias que habitan en el suelo con capacidad de solubilizar fosfatos, por ejemplo, Kucey (1983) encontró un 0.5% de bacterias solubilizadoras de fosfato en relación al total aislado en diferentes suelos cultivados y no cultivados de Alberta, Canadá; Lara *et al.* (2011) mencionan que las bacterias que solubilizan fosfato representan el 10% de la población microbiana del suelo y De Freitas *et al.* (1997) obtuvieron un 32% de rizobacterias solubilizadoras de fosfatos de la rizósfera de trigo y chícharo. La mayor proporción de bacterias solubilizadoras de fosfato que se observaron en este trabajo, comparada con las obtenidas en los otros estudios mencionados, podría facilitar la obtención de biofertilizantes capaces de reducir la aplicación de fertilizantes fosfatados al utilizar microorganismos capaces de mejorar la disponibilidad de este nutriente en suelos calcáreos.

Producción de Ácido Indolacético (AIA)

La síntesis de AIA es uno de los mecanismos más importantes de las PGPR para favorecer el crecimiento vegetal. Diferentes estudios han mostrado que la producción de auxinas como el AIA es una propiedad bastante extendida entre las bacterias del suelo. Ahmad *et al.* (2008) observaron que el 100% de *Pseudomonas* que aislaron de suelo rizosférico y más del 80% de *Azotobacter* y de *Mesorhizobium ciceri* produjeron AIA; en otro estudio, Khalid *et al.* (2004) mostraron que el 73% de las bacterias aisladas de plantas de trigo

Cuadro 1. Rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas del rizoplano de plantas de chile habanero, maíz y calabaza.

Chile habanero	Maíz	Calabaza
TSBPENCH4	TSBPENM1	TSBPENC2
TSBPENCH6*	TSBPENM3	TSBPENC3
TSBPOLCH1	TSBPOLM2	TSBPOLC3
TSBPOLCH5*	TSBPOLM6	TSBPOLC4
TSACH2	TYM4	KC1
KCH2*	TYM5	KC2
KCH3	TYM6	KC3
KCH4*	KM2	KC4
KCH5	KM5*	KC5*
	KM7	KC7
	KM8*	KC9
	KM9	KC10

* Cepas que también producen ácido indolacético (AIA).

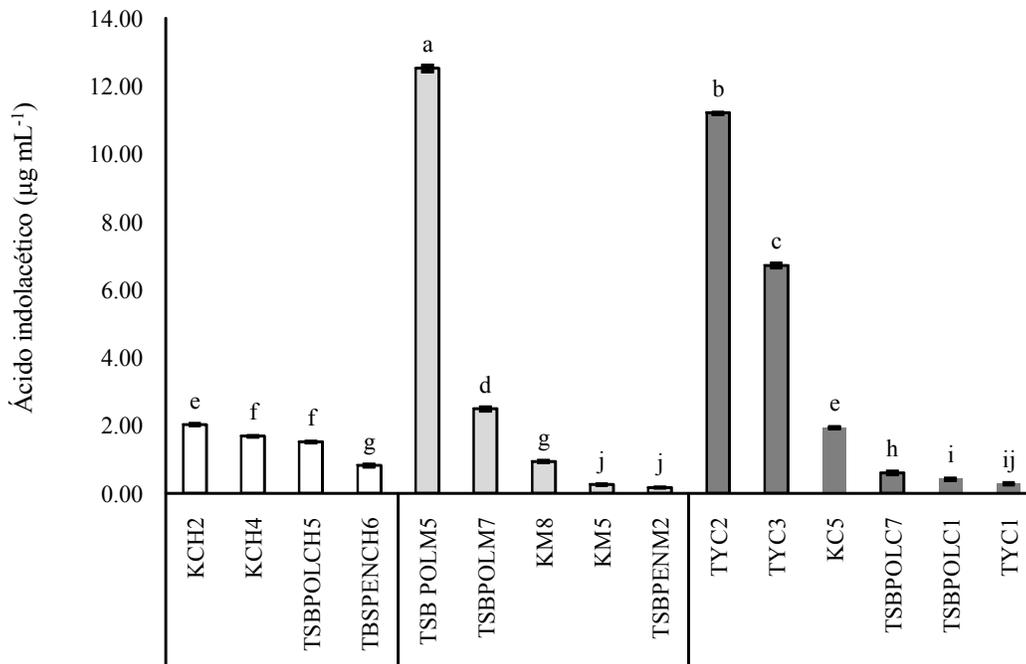


Figura 1. Ácido indolacético bacteriano sintetizado *in vitro*. Las barras representan el promedio de tres repeticiones; las barras de error denotan desviación estándar; letras diferentes indican diferencias significativas (método DMS, $P < 0.05$).

sintetizaron AIA. En el presente trabajo se observó la síntesis de este regulador del crecimiento en 15 cepas (18% del total que fueron aisladas) (Figura 1), con un promedio de $2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las cepas obtenidas de chile habanero produjeron en promedio $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, en tanto que las cepas aisladas de maíz y calabaza promediaron 3.3 y $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, respectivamente. Múltiples estudios han demostrado la capacidad de diversas especies bacterianas de producir AIA en un amplio rango de concentraciones, sin embargo, no todas las bacterias que producen AIA estimulan el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* produce hasta $78 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA y otros metabolitos, provocando una alteración en la fisiología de la planta, dando lugar a la enfermedad conocida como “agalla de la corona” cuyos síntomas son tumores en raíces, tallos y ramas en diversas especies vegetales (Liu *et al.*, 1982; Khakipour *et al.*, 2008; Farzana *et al.*, 2009; Zarrin *et al.*, 2009; Wahyudi *et al.*, 2011; Lara-Mantilla *et al.*, 2011). El ácido indolacético estimula la elongación de raíces de haba (*Vicia faba*) a concentraciones menores de $17.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que a concentraciones mayores a 87.5 inhibe drásticamente el crecimiento (El-Antably y Larsen, 1974). Por otro lado, Khalid *et al.* (2004) aislaron bacterias de la rizósfera de plantas de trigo que sintetizaron AIA a concentraciones de 1.1 a

$12.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y estimularon el crecimiento de dicha especie vegetal. Igualmente García *et al.* (2010), aislaron cepas de *Azospirillum* que produjeron de 18.02 a $38.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, las cuales estimularon el crecimiento de plantas de arroz. La concentración del AIA necesaria para estimular el crecimiento de las plantas depende de la especie de la misma. Así, mientras para una especie vegetal cierta concentración es adecuada para estimular su crecimiento, para otras, dicha concentración pudiera no tener influencia significativa. El AIA producido por las rizobacterias aisladas en este trabajo podría estimular el crecimiento de cultivos de importancia económica como el tomate y el chile habanero.

Solubilización de Fósforo

Treinta y tres de las rizobacterias aisladas tuvieron la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico (fosfato tricálcico) *in vitro* (Cuadro 1). Diversos trabajos han mostrado que algunas rizobacterias solubilizadoras de fósforo pueden aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo y estimular el crecimiento y la producción de diferentes especies de plantas cultivadas. Sundara *et al.* (2002) reportaron que la bacteria *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* incrementó el fósforo disponible

en el suelo dando como resultado un incremento en el rendimiento de jugo y azúcar de caña de azúcar. Otros estudios han reportado resultados similares en el mejoramiento del crecimiento de plantas por la aplicación de las rizobacterias que solubilizan fosfato, como en los casos de lechuga, maíz, canola y tomate (Laheurte y Berthelin, 1988; Chabot *et al.*, 1996; De Freitas *et al.*, 1997; El-Yazeid y Abou-Aly, 2011). Asimismo, se sabe que la estimulación del crecimiento por las PGPR se da principalmente por la combinación de los diversos mecanismos de la fisiología bacteriana. Wahyudi *et al.* (2011) observaron que cepas de *Bacillus* sp. aisladas de plantas de soya, que solubilizan fosfato y sintetizan AIA y sideróforos, estimularon el crecimiento de plantas de soya. Walpola y Yoon (2013) reportaron que las bacterias *Pantoea agglomerans* y *Burkholderia anthina* que solubilizan fosfato, sintetizan AIA, sideróforos, amonio, cianuro de hidrógeno y la enzima ACC desaminasa, incrementaron el crecimiento de plantas de tomate. En este trabajo, siete de las rizobacterias solubilizadoras de fosfato también sintetizaron AIA (Cuadro 1).

Efectos de las Rizobacterias Aisladas en el Crecimiento de Plántulas de Tomate

En la producción de plántulas en invernadero, los aislados KCH3 y TSACH2 incrementaron de manera significativa la producción de materia seca de la parte aérea en 42 y 32% respectivamente comparados con el testigo sin inoculación (Figura 2, Cuadro 2). Los otros

siete aislados fueron estadísticamente similares al testigo. Se ha documentado que algunas rizobacterias que solubilizan fosfato pueden estimular el crecimiento vegetal. El-Yazeid y Abou-Aly (2011) mostraron que las rizobacterias *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, inoculadas a plantas de tomate, mejoraron significativamente diferentes parámetros de crecimiento de las plantas (grosor del tallo, número de ramas y área foliar), contenido de pigmentos fotosintéticos, contenido mineral (N, P, K y Mg), contenido total de azúcares, carbohidratos y proteína cruda en las hojas, así como el amarre de frutos, la producción temprana y total de frutos. Otros cultivos que han mejorado su crecimiento y producción al ser inoculados con rizobacterias solubilizadoras de fósforo incluyen la canola (De Freitas *et al.*, 1997), la soya (Fernández *et al.*, 2007) y el maíz (Hameeda *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, la solubilización de fosfatos por los aislados KCH3 y TSACH2, probablemente influyó en la promoción del crecimiento observado en las plántulas de tomate. Las aguas duras y alcalinas de Yucatán con alto contenido de calcio y bicarbonato (pH de 7.62, 109.81 mg L⁻¹ de Ca y 370 mg L⁻¹ de bicarbonatos en las aguas utilizadas en el cultivo experimental), favorecen la precipitación del fósforo aplicado en forma de complejos insolubles de fosfato de calcio (Tredler, 2005; Imas, 1999), reduciendo de esta forma la disponibilidad del elemento para las plantas. El uso de rizobacterias solubilizadoras de fosfato, podría contribuir a mejorar la disponibilidad de este elemento



Figura 2. Efecto de los aislados TSACH2 y KCH3 en el crecimiento de plántulas de tomate en comparación al testigo sin inocular.

Cuadro 2. Crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con rizobacterias.

Tratamiento	Altura	Diferencia/testigo	Materia seca	Diferencia/testigo
Rizobacteria	cm	%	mg planta ⁻¹	%
TSBPOLCH1	13.10 (± 0.82) ^{ab}	25	97.0 (± 25.4) ^c	7.7
TSBPOLCH5	11.53 (± 0.82) ^{cd}	10	91.0 (± 18.5) ^c	1.0
TSBPENCH4	13.10 (± 0.82) ^{ab}	25	104.0 (± 21.2) ^{bc}	15.5
TSBPENCH6	12.54 (± 0.82) ^{bc}	19	93.0 (± 18.3) ^c	1.0
KCH3	14.29 (± 0.82) ^a	36	128.0 (± 26.2) ^a	42.2
KCH4	10.88 (± 0.82) ^d	3	102.0 (± 11.3) ^{bc}	13.3
KCH5	12.00 (± 0.82) ^{bcd}	14	106.0 (± 18.0) ^{bc}	17.7
TSACH2	12.63 (± 0.82) ^{bc}	20	119.0 (± 26.0) ^{ab}	32.2
Testigo	10.51 (± 0.82) ^d		90.0 (± 28.3) ^c	
CV	14.08		21.53	

± = desviación estándar; CV = coeficiente de variación. Letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente (DMS, $P < 0.05$).

para la nutrición de las plantas cultivadas en condiciones de fertirriego como en el presente caso. Asimismo, no se descarta el efecto de algún otro de los mecanismos que no han sido estudiados en las dos rizobacterias referidas, como la síntesis de otros reguladores del crecimiento vegetal y diversos compuestos como el ácido giberélico, las citoquininas y ácidos orgánicos que también estimulan el crecimiento vegetal (Arkhipova *et al.*, 2005; Vikram *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Se detectó la capacidad de síntesis de ácido indolacético en 15 (18%) rizobacterias del total de microorganismos aislados y 33 (40%) solubilizaron fósforo inorgánico *in vitro*. El ensayo de producción de plántulas de tomate en invernadero, mostró un incremento significativo en la biomasa de las plántulas inoculadas con los aislados KCH3 y TSACH2, los cuales podrían tener potencial para utilizarlos como biofertilizantes. Es necesario repetir los ensayos para confirmar esos resultados, así como realizar estudios genéticos para la identificación de los aislados bacterianos, pruebas de antagonismo contra microorganismos fitopatógenos, de producción de diversos reguladores del crecimiento vegetal, de sideróforos y demás características que permitan detectar el potencial de aprovechamiento respecto a la capacidad de estas bacterias para mejorar el crecimiento vegetal. Será de gran interés determinar si ambos aislados pueden mejorar el crecimiento del cultivo en etapas más avanzadas que la de plántula, así como el rendimiento.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del presente trabajo mediante el convenio MOD-ORD-16-08 PCI-033-60-04-08, y al Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY) por el apoyo con sus equipos e instalaciones durante el aislamiento y caracterización de las rizobacterias.

LITERATURA CITADA

- Ahmad, F., I. Ahmad, and M. S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.
- Antoun, H. and J. W. Kloepper. 2001. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). pp. 1477-1480. *In*: S. Brenner and J. H. Miller (eds.). *Encyclopedia of genetics*. Academic Press. New York, NY, USA.
- Arkhipova, T. N., S. U. Veselov, A. I. Melentiev, E. V. Martynenko, and G. R. Kudoyarova. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272: 201-209.
- Armenta-Bojórquez, A. D., C. García-Gutiérrez, J. R. Camacho-Báez, M. A. Apodaca-Sánchez, L. Gerardo-Montoya y E. Nava-Pérez. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai* 6: 51-56.
- Arshad, M. and W. T. Frankenberger Jr. 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133: 1-8.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, and J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233-266.
- Bashan, Y., G. Holguin, and R. Lifshitz. 1993. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. pp.331- 345. *In*: B. R. Glick and J. E. Thompson (eds.).

- Methods in plant molecular biology and biotechnology. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Berg, G., S. Kurze, A. Buchner, E. M. Wellington, and K. Smalla. 2000. Successful strategy for the selection of new strawberry associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium* wilt. *Can. J. Microbiol.* 46: 1128-1137.
- Chabot, R., H. Antoun, and M. P. Cescas. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Plant Soil* 184: 311-321.
- De Freitas, J. R., M. R. Banerjee, and J. J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing Rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 24: 358-364.
- Di Renzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. W. Robledo. InfoStat version 2010. GrupoInfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- El-Antably, H. M. M. and P. Larsen. 1974. Distribution of gibberellins and abscisic acid in geotropically stimulated *Vicia faba* roots. *Physiol. Plant.* 32: 322-329.
- El-Yazeid, A. A. and H. E. Abou-Aly. 2011. Enhancing growth, productivity and quality of tomato plants using phosphate solubilizing microorganisms. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5: 371-379.
- Farzana, Y., O. Radziah, S. Kamaruzaman, and S. S. Mohd. 2009. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *African J. Microbiol. Res.* 3: 815-821.
- Fernández, L. A., P. Zalba, M. A. Gómez, and M. A. Sagardoy. 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils* 43: 805-809.
- García, F., H. Muñoz, C. Carreño y G. Mendoza. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria* 1: 107-116.
- Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. Li. 1998. A model for the lowering of the plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190: 63-68.
- Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793-796.
- Grageda-Cabrera, O. A., A. Díaz-Franco, J. J. Peña-Cabriaes y J. A. Vera-Núñez. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3: 1261-1274.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F. R. Tadeo, and M. Talon. 2001. The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111: 206-211.
- Hameeda, B., G. Harini, O. P. Rupela, S. P. Wani, and G. Reddy. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163: 234-242.
- Hernández-Rodríguez, A., M. Hendrich-Pérez, M. G. Velázquez del Valle y A. N. Hernández-Lauzardo. 2006. Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24: 42-49.
- Herrera-Cervera, J. A., J. Caballero-Mellado, G. Laguerre, H. V. Tichy, N. Requena, N. Amarger, E. Martínez-Romero, J. Olivares, and J. Sanjuan. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 87-97.
- Imas, P. 1999. Recent techniques in fertigation of horticultural crops in Israel. pp. 11-12. *In: Workshop on recent trends in nutrition management horticultural crops.* Dapoli, Maharashtra, India.
- Keneni, A., F. Assefa, and P. C. Prabu. 2010. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean of Ethiopia and their abilities on solubilizing insoluble phosphates. *J. Agric. Sci. Technol.* 12: 79-89.
- Khakipour, N., K. Khavazi, H. Mojallali, E. Pazira, and H. Asadirahmani. 2008. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 4: 687-692.
- Khalid, A., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.
- Kucey, R. M. N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63: 671-678.
- Laheurte, F. and J. Berthelin. 1988. Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. *Plant Soil* 105: 11-17.
- Lara, C., L. M. Esquivel-Ávila y J. L. Negrete-Peñata. 2011. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba, Colombia. *Biotechnol. Sector Agropec. Agroindust.* 2: 114-120.
- Lara-Mantilla, C., L. Oviedo-Zumaqué y C. A. Betancur-Hurtado. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootec. Trop.* 29: 187-194.
- Leeman, M., F. M. den Ouden, J. A. van Pelt, F. P. M. Dirkx, H. Steijl, P. A. H. M. Bakkerand, and B. Schippers. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86: 149-155.
- Liu, S. T., K. L. Perry, C. L. SchardL, and C. I. Kado. 1982. *Agrobacterium* Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 2812-2816.
- Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Haas, and G. Défago. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology* 82: 190-195.
- Mehta, S. and C. S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 51-57.
- Mojica-Marín, V., H. A. Luna-Olvera, C. F. Sandoval-Coronado, B. Pereyra-Alfárez, L. H. Morales-Ramos, N. A. González-Aguilar, C. E. Hernández-Luna y O. G. Alvarado-Gómez. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Fyton* 78: 105-110.
- Paredes-Mendoza, M. y D. Espinosa-Victoria. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28: 61-70.
- Parvin, J., T. Vidit, and B. Ballabh. 2011. Characterization of Rhizobacteria diversity isolated from *Oryza sativa* cultivated at different altitude in north Himalaya. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2: 208-216.

- Patten, C. L. and B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Rodríguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-349.
- Rudrappa, T, M. L. Biedrzycki, S. G. Kunjeti, N. M. Donofrio, K. J. Czymmek, P. W. Paré, and H. P. Bais. 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Commun. Integr. Biol.* 3: 130-138.
- Sgroy, V., F. Cassán, O. Masciarelli, M. F. del Papa, A. Lagares, and V. Luna. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 371-381.
- Singh, A. V., S. Shah, and B. Prasad. 2010. Effect of phosphate solubilizing bacteria on plant growth promotion and nodulation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Hill Agric.* 1: 35-39.
- Sundara, B., V. Natarajan, and K. Hari. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Res.* 77: 43-49.
- Treder, W. 2005. Variation in soil pH, calcium and magnesium status influenced by drip irrigation and fertigation. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 13: 59-70.
- Van-Loon, L. C., P. A. Bakker, and C. M. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- Vikram, A., H. Hamzehzarghani, A. R. Alagawadi, P. U. Krishnaraj, and B. S. Chandrashekar. 2007. Production of plant growth promoting substances by phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols. *J. Plant Sci.* 2: 326-333.
- Wahyudi, A. T., R. P. Astuti, A. Widyawati, A., Meryandini, and A. A. Nawangsih. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *J. Microbiol. Antimicrobials* 3: 34-40.
- Walpola, B. C. and M. H. Yoon. 2013. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorus uptake. *African J. Microbiol. Res.* 7: 266-275.
- Wang, M. X., J. Liu, S. L. Chen, and S. Z. Yan. 2012. Isolation, characterization and colonization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacteria XG32 and DP24. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1155-1162.
- Zarrin, F., M. Saleemi, Z. Muhammad, T. Sultan, M. Aslam, R. U. Rehman, and M. F. Chaudhary. 2009. Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *African J. Biotechnol.* 8: 219-225.