
AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y DISOLVENTES DE FOSFATOS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

Haydee B. Peña e Isbelia Reyes

RESUMEN

La necesidad apremiante de estrategias sostenibles y de bajo impacto agrícola en agricultura requiere del desarrollo de preparados microbianos que mejoren la nutrición de las plantas. Se propuso obtener bacterias promisorias como promotoras del crecimiento, provenientes de la rizósfera y de las semillas de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Se detectó la colonización rizosférica de por lo menos siete cepas de *Rhizobium*, identificadas mediante una prueba de nodulación con *Phaseolus vulgaris* y de crecimiento en los medios GPA, ELMABAT, y NaCl 2, 3 y 5%. Dichos rizobios disolvieron hidroxapatita y en algunos casos mostraron crecimiento en $\geq 2\%$ NaCl. En los macerados de las semillas se observó la presencia de bacterias endófitas carac-

terizadas por su comportamiento microaeróbico y productor de ácido detectado por el viraje de verde a amarillo en el medio Nfb-glucosa. Al evaluar el efecto de la inoculación de dos rizobacterias probablemente del género *Rhizobium*, las cepas 33 y 45, y otra de naturaleza endófitica, la cepa M, en semillas de lechuga, se encontró que la cepa 33 y el consorcio 3345 incrementaron significativamente ($p \leq 0,05$) el peso seco de las plántulas con 30 días de edad en relación al testigo no inoculado. Aunque todas las cepas bacterianas produjeron AIA en ausencia y presencia de triptófano, éste no es el único parámetro implicado en la promoción del crecimiento de las plántulas de lechuga.

NITROGEN FIXING BACTERIA AND PHOSPHATE SOLUBILIZERS ISOLATED IN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) AND EVALUATED AS PLANT GROWTH PROMOTERS

Haydee B. Peña and Isbelia Reyes

SUMMARY

The urgent need for sustainable and low environmental impact strategies in agriculture requires the development of microbial preparations that improve plant nutrition. The present work was carried out with the purpose of obtaining promising growth promoter bacteria from the rhizosphere and seeds of lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. At least seven strains belonging to the genus *Rhizobium* were detected as rhizosphere colonizers, identified with the nodulation test using *Phaseolus vulgaris* as host plant and by their growth in GPA, YEM containing bromotimol blue media and NaCl 2, 3 and 5% media. These rhizobia were hydroxyapatite solubilizers, and in some cases they were able

to grow at $\geq 2\%$ NaCl. Endophytic bacteria were isolated from ground seeds and characterized by their microaerobic growth and acid production, as revealed when turning from green to yellow the Nfb-glucose medium. The inoculation into lettuce seeds of two potential rhizospheric *Rhizobium* spp., strains 33 and 45, and the endophytic strain M, showed that strain 33 and the consortium 3345 exhibited higher ($p \leq 0.05$) dry weight of 30 day plantlets than the non-inoculated control. Even though all bacterial strains produced IAA with and without tryptophane, this is not the only parameter implicated in growth promotion of lettuce plantlets.

Introducción

Dada la necesidad de aumentar las respuestas de la agricultura para la alimentación humana disminuyendo el uso de agroquímicos, las investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de nuevas biotecnologías. En los últimos años ha habido un interés creciente en los microorganismos

benéficos del suelo, ya que éstos pueden promover el crecimiento de las plantas y en algunos casos también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos. Tales microorganismos pueden ser simbióticos o de vida libre. En este último caso están asociados a las partículas del suelo e interactúan con las raíces de las plantas al en-

contrarse en los gránulos de suelo adheridos a las mismas en la zona de la rizósfera, donde son capaces de ejercer un conjunto de interacciones producto de la competencia por nutrientes. Una de las razones principales 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). Por su parte, los microorganismos de la rizósfera estimulan la exudación de la raíz a través de la liberación de variadas sustancias producto de su metabolismo (Lugtenberg *et al.*, 2002).

El uso de microorganismos rizosféricos como una biotecnología se ha llevado a la práctica mediante

PALABRAS CLAVE / Endófitas / Lechuga / PGPR / Rizobacterias /

Recibido: 21/02/2007. Modificado: 10/07/2007. Aceptado: 11/07/2007.

Haydee B. Peña. Ingeniero Agrónomo y M.Sc. en Agronomía, Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Venezuela. Profesor UNET,

Venezuela. Dirección: Departamento de Ingeniería Agronómica. UNET. e-mail: hpena@unet.edu.ve

Isbelia Reyes. Licenciada en Biología, University of Ottawa, Canadá. M.Sc. en Ecología Tropical, Universidad de los Andes, Venezuela. Ph.D. en

Microbiología, Université Laval, Canadá. Profesora, UNET, Venezuela. e-mail: isreyes@unet.edu.ve.

ISOLAMIENTO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS FIJADORAS DE NITROGÊNIO E FOSFODISOLVENTES NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DA ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

Haydee B. Peña e Isbelia Reyes

RESUMO

A necessidade apremiante de estratégias sustentáveis e de baixo impacto na agricultura requer do desenvolvimento de preparados microbianos que melhorem a nutrição das plantas. Dada esta premissa se propôs obter bactérias promisorias como promotoras do crescimento, provenientes da rizósfera e das sementes da alface (*Lactuca sativa* L.). Detectou-se a colonização rizosférica de pelo menos sete cepas de *Rhizobium*, identificadas mediante uma prova de nodulação com *Phaseolus vulgaris* e de crescimento nos meios GPA, ELMABAT, e NaCl 2, 3 e 5%. Ditos rizobios dissolveram hidroxiapatita e em alguns casos mostraram crescimento a concentrações de NaCl $\geq 2\%$. Nos macerados das sementes se observou a presença de bactérias

endófitas caracterizadas por seu comportamento microaeróbico e produtor de ácido detectado pela viragem de verde a amarelo no meio Nfb-glucosa. Ao avaliar o efeito da inoculação de duas rizobactérias do gênero *Rhizobium*, cepas 33 e 45, e outra de natureza endofítica, a cepa M, nas sementes de alface, encontrou-se que a cepa 33 e o consórcio 3345 incrementaram significativamente ($p \leq 0,05$) o peso seco das plântulas com 30 dias de idade em relação à testemunha não inoculada. Ainda que todas as cepas bacterianas produziram AIA em ausência e presença de triptófano, este não foi o único parâmetro implicado na promoção do crescimento das plântulas de alface.

la inoculación de semillas. Los primeros trabajos para la bacterización de semillas fueron realizados en Rusia en 1930. A finales de la década de los 70, Kloepper (1994) utilizó el término PGPR (*plant growth promoting rhizobacterias*; rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) para referirse a las rizobacterias capaces de provocar un efecto benéfico en las plantas. Recientemente, la denominación se ha extendido a microorganismos PGP para incluir hongos y cualquier organismo afín (Vessey, 2003). Sin embargo, en la última década un interés creciente ha sido dirigido hacia los microorganismos endófitos, los cuales al estar menos afectados por el estrés ambiental y más aclimatados con su hospedero (Sturz y Nowak, 2000) podrían representar una mayor ventaja ecológica. Sin embargo, la presencia de bacterias endófitas y su papel dependen probablemente del cultivar y de su coevolución con la especie microbiana (Yanni *et al.*, 2001).

La expresión de la capacidad promotora del crecimiento de las plantas inoculadas en ensayos de laboratorio, invernadero y campo ha sido evaluada a través de diversos parámetros, tales como el incremento de la elongación del tallo y de las raíces, el estado nutricional de las

plantas tratadas, la ganancia en materia seca, el contenido de proteínas y el valor nutricional del grano (Yanni *et al.*, 2001, Tilak y Srinivasa, 2006). La capacidad para colonizar las raíces es una condición indispensable para que una bacteria sea considerada como una verdadera PGPR, siendo por tanto esa capacidad un primer paso y un rasgo crucial para la selección de los inóculos microbianos a ser usados como biofertilizantes, biopesticidas, fitoestimuladores o biorremediadores (Lugtenberg *et al.*, 2001). Es también un primer indicio de que el microorganismo es capaz de lograr el efecto benéfico esperado. Además de la capacidad de colonización, el éxito en la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal reside en el estudio de cepas compatibles y específicas a los diversos cultivos y a las condiciones ambientales prevalentes.

En una búsqueda de estrategias enmarcadas en el manejo sostenible de rubros hortícolas, en este trabajo se reporta el aislamiento de rizobacterias y bacterias endófitas disolventes de fosfatos y fijadoras de nitrógeno provenientes de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), y la evaluación de su inoculación en el efecto promotor del crecimiento de las plántulas en etapa de semillero.

Materiales y Métodos

Aislamiento de rizobacterias en plantas de *L. sativa*

Se aislaron microorganismos con potencial promotor del crecimiento vegetal provenientes de la rizósfera de plantas de lechuga cultivadas en el Módulo de Producción y Evaluación de Tecnologías Sostenibles (MOPREVATS) en la Unidad Académica "La Primavera" perteneciente a la Universidad Nacional Experimental del Táchira ubicada en el Municipio Andrés Bello, estado Táchira, Venezuela, a 1250msnm. El análisis de suelo del área cultivada presentó las siguientes características físico-químicas (Bateman, 1970): textura franca (Bouyucos); pH 6,5 (suelo:agua= 1:1); conductividad eléctrica 0,1Mmhos·cm⁻¹; materia orgánica (Walkley y Black) 3,1%; P (Bray I) 9ppm; Ca, K y Mg (acetato de amonio, por espectrofotometría de absorción atómica) 2093, 184 y 85ppm, respectivamente. La raíz de las plantas fue extraída en su totalidad junto con el suelo circundante, sin ocasionar daños mecánicos. Las muestras fueron transportadas en una cava con hielo seco. El suelo no rizosférico fue separado cuidadosamente de las raíces al agitar moderadamente la muestra, quedando adherido a las raíces el suelo

rizosférico. Posteriormente, se preparó una suspensión con dicho suelo (0,5-1,0g de suelo seco) al sumergir las raíces en 10ml de una solución estéril de NaCl 0,89% y al centrifugar a 200rpm durante 30min (Reyes *et al.* 2002). La suspensión obtenida constituyó la dilución 1/10, a partir de la cual se realizaron diluciones hasta 1x10⁻⁶. Para el conteo de hongos totales se utilizó medio PDA (papa-dextrosa-agar) con sulfato de estreptomina (100µg·ml⁻¹) y cloranfenicol (30µg·ml⁻¹). Para el conteo de bacterias totales se empleó caldo nutritivo a 1/10 de la concentración estándar. Se usó el medio mínimo con hidroxiapatita (MM-HA; Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) para el conteo de hongos y bacterias fosfodisolventes, preparado (para un litro de agua) con 0,1g NaCl; 0,4g NH₄Cl; 0,78g KNO₃; 0,50g MgSO₄·7H₂O; 0,1g CaCl₂·2H₂O; 0,5mg FeSO₄·7H₂O; 1,56mg MnSO₄·4H₂O; 1,40mg ZnSO₄·7H₂O; 10g glucosa; y 2,7g HA (0,05% P) todo tamizado a 100 mallas; y 20g de agar (Reyes *et al.*, 1999). Adicionalmente, para el aislamiento de hongos fosfodisolventes se agregó 30mg de sulfato de estreptomina y 100mg de cloranfenicol. El medio ELMARC (extracto de levadura-manitol-agar-rojo congo) fue utilizado para el aislamiento de posibles rizobios (Ferra-

ra, 1993) y el mismo medio ELMARC, sustituyendo la fuente de fósforo soluble por HA, permitió el aislamiento selectivo de potenciales cepas de *Rhizobium* con poder fosfodisolvente.

Determinación de bacterias simbióticas fijadoras de N₂

Para la evaluación de la capacidad de nodulación de las potenciales cepas de *Rhizobium* se utilizó *Phaseolus vulgaris* como planta indicadora, bajo el protocolo descrito por Ferrara (1993). Para esto, se esterilizó la superficie de las semillas de *P. vulgaris* con etanol 85% por 2min, NaClO al 5,25% por 15min, seguidos de 3 y 10 enjuagues, respectivamente, con agua desmineralizada estéril. Posteriormente se prepararon suspensiones bacterianas con los aislamientos rizosféricos promisorios que crecieron en el medio ELMARC formando las características colonias rosadas del género *Rhizobium*, y que también presentaron el mayor crecimiento y halo de disolución en el medio de ELMARC-HA.

Las semillas de *P. vulgaris* fueron inoculadas utilizando suspensiones bacterianas con una densidad poblacional de aproximadamente 1x10⁷UFC·ml⁻¹. Las siembras fueron realizadas por quintuplicado para cada uno de los aislamientos seleccionados utilizando macetas de 250ml provistas de drenaje y con doble fondo rellenas con una mezcla 1:1:1 de arena:turba:vermiculita, esterilizada por tindalización. Se evaluaron nueve aislamientos y se incluyó un testigo sin inocular. Las plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento regándolas, de forma interdiaria, con agua y solución Hoagland a ¼ para los macronutrientes y fórmula completa para los micronutrientes. A los 45 días se efectuó el reaislamiento de los rizobios a partir de los nódulos correspondientes a cada tratamiento, y los aislamientos seleccionados se

caracterizaron mediante las siguientes pruebas bioquímicas establecidas para las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (Ferrara, 1993; Holt *et al.*, 2000): ELMARC con NaCl 1, 3 o 5%; glucosa-peptona-agar-púrpura de bromocresol (GPA) y extracto de levadura-manitol-agar-azul de bromotimol (ELMABAT). También se evaluó la disolución de fosfatos en los medios ELMARC-HA y MM-HA.

Aislamiento de bacterias endófitas de semillas de lechuga

Para el aislamiento de bacterias endófitas a partir de las semillas de lechuga se esterilizó previamente la cubierta siguiendo el protocolo utilizado para las semillas de *P. vulgaris*; luego, éstas fueron lavadas en agua estéril durante 15min y posteriormente en solución salina estéril por 30min con movimiento constante a 140rpm. La suspensión obtenida fue sembrada en los medios MM (testigo), ELMARC, Manitol (Holt y Krieg, 1994) y Nfb-glucosa sólido y semisólido (Döbereiner *et al.*, 1999), para determinar la presencia de microorganismos no endófitos. Seguidamente se tomaron semillas seleccionadas al azar, se maceraron en morteros estériles y se realizaron diluciones seriadas de 1/10 hasta 1x10⁻³ por triplicado, para finalmente sembrar las diluciones en placas de Petri con los medios señalados.

TABLA I.
CONTEO DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS TOTALES Y DISOLVENTES DE FOSFATOS EN PLANTAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.) CULTIVADAS BAJO MANEJO SOSTENIBLE

Poblaciones Microbianas	Media ±DS (UFC·g ⁻¹ suelo)	%
	Hongos (x10 ⁴)	
Totales	12,0 ±3,3	100
Disolventes de HA	5,9 ±2,9	49,3
	Bacterias (x10 ⁷)	
Totales	4,3 ±1,5	100
Disolventes de HA	2,9 ±1,9	67,4

HA: hidroxapatite.

Selección de las cepas bacterianas y determinación de AIA

El potencial efecto promotor de crecimiento de los aislamientos provenientes de la rizósfera y del interior de las semillas de lechuga fue seleccionado en base a la fijación de N₂, la disolución de fosfatos y la tolerancia a altas concentraciones de NaCl. Los aislamientos fueron posteriormente evaluados para la producción de ácido indolacético (AIA) en presencia y ausencia de triptófano, según Glickmann y Dessaux (1995).

Inoculación de bacterias en semillas de *L. sativa*

El efecto promotor de crecimiento por la inoculación de las bacterias seleccionadas fue evaluado en condiciones de semillero, para lo que se prepararon cultivos puros esperando hasta el momento de la inoculación para la preparación de los

consorcios. Se realizó la esterilización de la cubierta seminal y la inoculación de las semillas de lechuga con los aislamientos seleccionados, por separado y en consorcio. Las semillas de lechuga fueron inoculadas y sembradas en bandejas de horticultura provistas de un sustrato comercial esterilizado por tindalización, y luego se llevaron a una cámara de crecimiento donde se les suministró irrigación con solución de Hoagland. A los 35 días después de la siembra se secó el material en una estufa con circulación de aire forzado, a 72°C durante 48h, y se cuantificó la materia seca total.

Análisis de los datos

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El análisis de varianza (ANOVA), así como la comparación de medias entre los tratamientos se realizó por el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

TABLA II
CARACTERIZACIÓN DE LOS POTENCIALES RIZOBIOS INOCULADOS Y REAISLADOS DE LOS NÓDULOS DE *Phaseolus vulgaris*

Prueba	Cepa								
	17	22	31	33	39	44	45	CI	CII
GPA	E	E	E	E	E	A	E	A	A
ELMABAT	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	N	Ac	B	Ac
MM-HA	+	+	-	-	+	-	+	+	-
ELMARC-HA	-	-	-	+	-	-	-	-	-
NaCl 2%	-	-	+	+	-	+	+	+	+
NaCl 3%	-	-	+	+	-	-	-	-	+
NaCl 5%	-	-	+	+	-	-	-	-	+

GPA: glucosa peptona agar púrpura de bromocresol, ELMABAT: extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol, MM-HA: medio mínimo con hidroxapatita, ELMARC-HA: extracto de levadura manitol agar rojo congo con hidroxapatita, E: escaso, A: abundante, Ac: ácido, N: neutro, B: básico.

Resultados

Aislamiento y caracterización de microorganismos provenientes de la rizósfera

Al cuantificar las poblaciones cultivables de microorganismos de la rizósfera de plantas de lechuga procedentes de la unidad académica "La Primavera" se encontró que las bacterias fueron más numerosas que los hongos, tanto totales como disolventes de HA (Tabla I). Las poblaciones de hongos y de bacterias fosfodisolventes cultivables constituyeron el 49,3 y 67,4%, respectivamente. También se aislaron posibles rizobios fosfodisolventes utilizando el medio ELMARC con HA como fuente de fosfato.

Las cepas evaluadas en la prueba de nodulación con *P. vulgaris* (Tabla II) indujeron la formación de nódulos a partir de los cuales se reaislaron nueve cepas bacterianas. En las pruebas bioquímicas se destacó la tolerancia a concentraciones de NaCl $\geq 2\%$, donde las cepas 31, 33 y CII, de las nueve cepas evaluadas, toleraron hasta 5% HCl, rasgo que sumado al crecimiento en el medio GPA y la producción de ácido o álcali en el medio ELMABAT permitió separar tres grupos, el de *Rhizobium* (cepas 17, 22, 31, 33, 39 y 45), el de *Bradyrhizobium* (cepa CI) y un tercer grupo no definido con las pruebas realizadas (cepas 44 y CII). De los potenciales rizobios evaluados, cinco disolvieron la HA en el MM-HA, uno en el medio ELMARC-HA, mientras que ninguna cepa se mostró disolvente de la HA en ambos medios de cultivo (Tabla II).

Cuantificación de bacterias endófitas en semillas de lechuga

Las poblaciones cultivables de bacterias endófitas en las semillas de lechuga fueron cuantificadas, encontrándose entre $74,1 \pm 30,4$ y $37,3$

TABLA III
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-3ACÉTICO (AIA) POR LAS CEPAS BACTERIANAS M, 33 Y 45 EN CALDO NUTRITIVO Y ELMARC EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE TRIPTÓFANO (L-TRP) A LAS 72H DE INCUBACIÓN

Cepa	AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	
	Sin L-TRP	Con L-TRP
33	20,3 b A	24,5 b A
45	6,8 a A	14,6 a B
M	18,1 b A	26,0 b B

Promedios de tres réplicas. La misma letra mayúscula en una columna o minúscula en una fila señala que los valores no difieren significativamente ($p < 0,01$) de acuerdo a la prueba LSD.

$\pm 18,3$ bacterias por semilla, cuando se utilizó los medios ELMARC y Nfb-glucosa, respectivamente.

Las bacterias endófitas que crecieron en el medio ELMARC no fueron identificadas. Sin embargo, al utilizar el medio Nfb específico para diazotrofos del género *Azospirillum*, se observó su presencia al formarse en los tubos con glucosa una biopelícula blanquecina subsuperficial típica de su crecimiento (Reis *et al.*, 2004). Este crecimiento reveló un comportamiento microaerófilo acompañado de un viraje del color del medio con azul de bromotimol, de verde a amarillo. El cambio de coloración mostró un descenso del pH de 6,5 a 4,0 por la fuerte producción de ácido.

Producción del AIA por los bioinoculantes de la lechuga

De acuerdo a esta prueba las tres cepas bacterianas

evaluadas en el ensayo de semillero son productoras de AIA. Los valores de producción de la fitohormona fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) en las cepas M y 33, tanto en presencia como en ausencia de triptófano, en comparación con la cepa 45. Así mismo, la presencia de triptófano en el medio promovió un incremento significativo ($p < 0,01$) en la producción del AIA por las cepas M y 45 (Tabla III).

Efecto de la biofertilización en el crecimiento de plántulas de lechuga

Al medir el efecto de la inoculación de las bacterias 33, 45 y M en forma aislada y en consorcio sobre el crecimiento de la lechuga en condiciones de semillero hasta los 30 días, se encontró un incremento significativo ($p < 0,05$) del peso seco de las plántulas al utilizar como inóculos la cepa 33

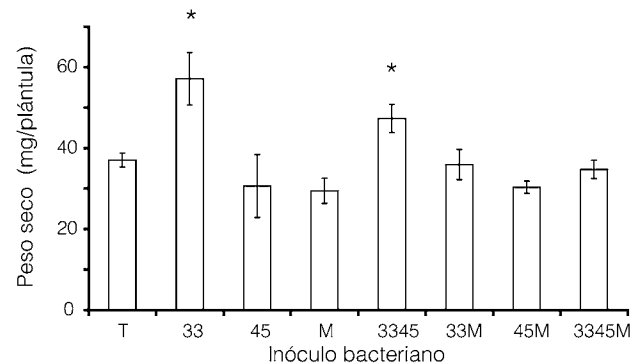


Figura 1. Peso seco de las plántulas de lechuga en condiciones de semillero a los 30 días de crecimiento e inoculadas con las rizobacterias cepas 33 y 45, y la bacteria endófitas de la semilla, cepa M, en forma aislada y en consorcio, respecto al testigo no inoculado (T). * denota diferencias estadísticas según la prueba LSD con un nivel de significancia de 0,05.

y el consorcio 3345 (Figura 1), en relación al testigo no inoculado.

Discusión y Conclusiones

Se detectó una abundante comunidad microbiana cultivable disolvente de fosfatos de calcio proveniente del suelo rizosférico de plantas de lechuga en condiciones de campo (Tabla I), comparada con la reportada por Reyes *et al.* (2006) para especies vegetales procedentes de suelos explotados y abandonados de una mina de roca fosfática, en donde las poblaciones cultivables disolventes de HA señaladas fueron de 29% para los hongos y 13% para las bacterias. La abundancia relativa de estas poblaciones microbianas indicaría el efecto de las características físico-químicas de los suelos sobre el potencial de disolución de este tipo de fosfatos. Si se considera el bajo contenido de fósforo disponible en el suelo del MOPREVATS (9ppm) y la alta exigencia de fósforo por parte de la lechuga, las altas poblaciones de microorganismos disolventes de fosfatos podrían estar actuando en la disolución del fósforo fijado en dicho suelo. Adicionalmente, es conocido que ante la liberación de exudados radicales ricos en fuentes de carbono, las bacterias pueden ser atraídas por procesos de quimiotaxis hacia la región rizosférica de la planta (Bacilio-Jiménez *et al.* 2003). Es así como la especie vegetal puede incidir en la abundancia de cierto grupo microbiano en sus raíces; por ejemplo, Chabot *et al.* (1996) hallaron a *Rhizobium* como la especie predominante tanto en lechuga como en maíz cuando las semillas de estas plantas se inocularon con otras dos PGPR, *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. Esta incidencia también se reflejó al sustituir el sustrato comercial no estéril por un suelo. Por su parte, Reis *et al.* (2004) destacaron, como condicionante de la mayor

o menor abundancia de microorganismos benéficos en el suelo, al manejo del cultivo y la época del muestreo combinado con el tipo de planta hospedera, debido a la composición de los exudados radicales y la relación C/N de la rizósfera.

En el presente trabajo se aislaron bacterias diazotróficas de la rizósfera de la lechuga y endófitas de las semillas del mismo cultivo. El uso de pruebas bioquímicas y de medios de cultivo permitió sospechar del aislamiento de bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum*; sin embargo, una caracterización completa y confiable de las cepas bacterianas debe ir acompañada de una caracterización de orden molecular como lo es, por ejemplo, la secuenciación del ADN ribosomal 16S (Govindarajan y Kwon, 2007).

Las poblaciones bacterianas endófitas presentes en las semillas de lechuga podrían provenir del suelo de origen de las plantas, el cual fue sometido a diferentes prácticas de cultivo de bajo impacto agrícola, tales como la rotación con leguminosas e incorporación de abonos verdes. En este sentido, se ha reportado que el interior de las raíces constituye un ambiente refugio para los rizobios en plantaciones de arroz bajo inundación y en rotación con trébol (Yanni *et al.*, 2001). La presencia de microorganismos endófitos fijadores de N₂ en las semillas de lechuga no es un hecho aislado ya que otros autores han encontrado microorganismos similares de especies tanto agronómicas como silvestres. Zinniel *et al.* (2002) reportaron la presencia de 853 aislamientos endófitos de plantas de soya, sorgo, trigo y maíz y 27 a partir de especies silvestres; algunos de estos aislamientos mostraron a su vez habilidad para persistir en los tejidos una vez que fueron reinoculados y se mostraron promisorios como biocontroladores. Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero

(2001) aislaron *R. etli* como endófito de granos de maíz. Otros géneros de similar importancia como bacterias endófitas son *Gluconacetobacter* en caña de azúcar (Cavalcante y Döbereiner, 1988), y *Burkholderia* en maíz (Perin *et al.*, 2006) y en esporas de la micorriza arbuscular *Gigaspora margarita* (Bianciotto *et al.*, 2000). En arroz y en caña de azúcar se ha demostrado que *Herbaspirillum* aumenta la asimilación de N₂ por la planta (Njoloma *et al.* 2006). Otro elemento de interés es la falta de especificidad de estas asociaciones con la planta hospedera, como se demostró con *Herbaspirillum* sp. B501gfp1 aislado del arroz salvaje, que al ser inoculado en plantas de caña de azúcar pudo colonizar los tejidos de la raíz y del tallo (Njoloma *et al.*, 2006).

De los aislamientos obtenidos en el presente trabajo, tanto epífitos como endófitos, se encontró que algunas bacterias presentaron potencial como biofertilizantes en plántulas de lechuga. Sin embargo, la cepa M, a pesar de su carácter endófito y rasgos propios como promotora del crecimiento al producir altos valores de producción de AIA, no mostró el efecto esperado, sino que deprimió el crecimiento de las plántulas en un 25,8%. Este resultado muestra, por consiguiente, que la producción de hormonas de crecimiento *in vitro* no necesariamente determina la acción biofertilizante de una bacteria, sino que otros factores deben ser considerados además de los relacionados con la capacidad competitiva y antagónica del microorganismo introducido en la rizósfera y su efecto sobre las poblaciones autóctonas de la rizósfera. De igual manera, otros autores han reportado resultados similares utilizando aislamientos endófitos de semillas de lechuga (Gomes *et al.*, 2003). Los rizobios aislados en este trabajo presentaron altos valores de producción

del AIA (6,76-24,5 µg·ml⁻¹; Tabla III), comparados con los obtenidos por Asgar *et al.* (2002), quienes reportan entre 0,33 y 11,40 µg·ml⁻¹ en presencia y ausencia del precursor de la auxina L-triptófano, producidos por algunas cepas bacterianas aisladas de *Brassica* spp.

La mayor promoción del crecimiento de las plántulas de lechuga fue inducida por la cepa 33, también con una alta capacidad productora del AIA, provocando un incremento de 32,3% del peso seco de las plántulas (Figura 1), comparado con el testigo no inoculado. Otro efecto a destacar es la inoculación combinada de las cepas 33 y 45, la cual produjo un incremento de 18,4% del peso seco que, aunque menor al producido por la inoculación individual de la cepa 33, mostró la buena calidad del consorcio. Otros trabajos señalan que los consorcios pueden establecer relaciones sinérgicas; Rodelas *et al.* (1999) reportan que la inoculación de *Rhizobium/Azotobacter* y *Rhizobium/Azospirillum* indujo una mayor acumulación de nutrientes en el tejido foliar de *Vicia faba* que cuando se utilizó *Rhizobium* en forma aislada.

Finalmente, la promoción del crecimiento como consecuencia de las interacciones exo-radicales pudiera ser no solo debida a la fijación de N₂ atmosférico (Antoun y Prévost, 2001), la disolución de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999), la producción de hormonas de crecimiento como el AIA (Lugtenberg *et al.*, 2001) y las giberelinas (Yanni *et al.*, 2001), sino también a mecanismos diferentes, como la supresión de patógenos a través de la liberación de sideróforos, antibióticos, enzimas hidrolíticas y ácido cianídrico (Klopper y Beauchamp, 1992). Por tanto, en el desarrollo de un biofertilizante habría que considerar si los mecanismos microbianos involucrados en la promoción del crecimiento de las plan-

tas y observados *in vitro* se expresan de igual manera en la rizósfera de la planta. Similarmente, en los consorcios la acción benéfica de cada inoculante actuaría en forma sinérgica entre ellos mismos y en su interacción con la planta.

REFERENCIAS

- Antoun H, Prévost D (2001) PGPR activity of *Rhizobium* with nonleguminous plants. *J. Plant Physiol.* 28: 45-870.
- Asgar H, Zahir Z, Arshad A, Khaliq A (2002) Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol. Fert. Soils* 35: 231-237.
- Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, Pérez-Campos, Bouquet E, 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.
- Bateman JV (1970) *Nutrición Animal. Manual de métodos analíticos*. Herrero Hermanos. Mexico. 468 pp.
- Benizri E, Baudoin E, Guckert A (2001) Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocont. Sci. Technol.* 11: 557-574.
- Bianciotto V, Lumini E, Lanfranco L, Minerdi D, Bonfante P, Peroto S (2000) Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family *Gigasporaceae*. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 4503-4509.
- Cavalcante V, Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Chabot R, Beauchamp Ch, Klopper J, Antoun H (1996) Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1615-1618.
- Döbereiner J, Vanderlei De Oliveira A, Baldani V (1999) *Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia*. www.npab.embrapa.br/servicios/download/doc110.pdf
- Ferrara CR (1993) *Manual de agromicrobiología*. Trillas. México. 142 pp.

- Glickmann R, Dessaux J (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 45: 631-640.
- Gomes A, Mariano R, Silveira E, Mesquita J (2003) Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. Na produção de mudas orgânicas de alface. *Hortic. Bras.* 21: 699-703.
- Govindarajan M, Kwon SW (2007) Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 997-1006.
- Gutiérrez-Zamora M, Martínez-Romero E (2001) Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays*). *J. Biotech.* 91: 117-126.
- Holt JG, Krieg NR (1994) Enrichment and isolation. En Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (Eds.) *Methods for General and Molecular Biology*. Ch. 8. ASM. Washington, DC, EEUU. pp. 179-212.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Stanley W (2000) *Manual of Determinative Bacteriology*. 9ª ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, EEUU. 787 pp.
- Kloepper J (1994) Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). En Okon J (Ed.) *Azospirillum / Plant association*. CRC. Boca Raton, FL, EEUU. pp 137-167.
- Kloepper J, Beauchamp Ch (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38: 1219-1232.
- Lugtenberg B, Dekkers L, Bloemberg G (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 461-90.
- Lugtenberg B, Thomas F, A-Woeng Ch, Bloemberg G (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Anton van Leeuwenhoek* 81: 373-383.
- Njoloma J, Tanaka K, Shimizu T, Nishiguchi T, Zakria M, Akashi R, Oota M, Akao S (2006) Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium *Herbaspirillum* sp. B501gtp1. *Biol. Fertil. Soils* 43: 137-143.
- Perin L, Martínez-Aguilar L, Castro-González R, Estrada-De Los Santos P, Cabellos-Avelar T, Guedes H, Reis V, Caballero-Mellado J (2006) Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Appl. Env. Microbiol.* 72: 3103-3110.
- Reis F Jr, Silva M, Teixeira K, Urquiaga S, Reis V (2004) Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R. Bras. Cie. Solo* 28: 103-113.
- Reyes I, Bernier L, Simard R, Tanguay P, Antoun H (1999) Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 291-295.
- Reyes I, Bernier L, Antoun H (2002) Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microb. Ecol.* 44: 39-48.
- Reyes I, Valery A, Valdez Z (2006) Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil* 287: 69-75.
- Rodelas B, González-López J, Martínez-Toledo M, Pozo C, Salmerón V (1999) Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba*). *Biol. Fert. Soils* 29: 155-169.
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- Sturz A, Nowak J (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl. Soil Ecol.* 15: 183-190.
- Tilak K, Srinivasa B (2006) *Bacillus cereus* and *B. circulans* novel inoculants for crops. *Curr. Sci.* 90: 642-644.
- Vessey K (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Yanni Y, Rizkabd El-Fattah Y, Squartini A, Corich V, Giacomini A, De Bruijn F, Rademaker J, Maya-Flores J, Ostrom P, Vega-Hernández M, Hollinsworth R, Martínez-Molina E, Mateos P, Velázquez E, Wopereis J, Triplett E, Umali-García M, Anarna J, Rolfe B, Ladha J, Hill J, Mujoo R, Dazzol F (2001) The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1-26.
- Zinnel D, Lambrecht P, Harris B, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru C, Arunakumari A, Barletta R, Vidaver A (2002) Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 2198-2208.