

## Artículo científico

## Bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a la rizósfera de yacón [*Smallanthus sonchifolius* (Poeppig) Robinson] y su capacidad para promover el crecimiento vegetal

### Phosphate solubilizing bacteria associated with the rhizosphere of yacón [*Smallanthus sonchifolius* (Poeppig) Robinson] and its ability to promote plant growth

P.I. Rodríguez; M.L. Aldonate; E.L. Ulla\*

Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Kirchner 1900, (4000), Tucumán, Argentina.

\*E-mail: elsaula59@gmail.com

#### Resumen

En los últimos años aumentaron las investigaciones en especies vegetales con fines nutraceuticos. Los antecedentes muestran que el desarrollo biotecnológico permite el uso de microorganismos en la producción de cultivos de valor comestible y propiedades medicinales como el yacón (*Smallanthus sonchifolius*). Los objetivos fueron: aislar y caracterizar bacterias solubilizadoras de fosfatos de la rizósfera de yacón; evaluar el índice de solubilización de fosfato tricálcico; comprobar la capacidad de las bacterias para solubilizar otros fosfatos (fosfato de hierro, fosfato de aluminio y Escorias Thomas); identificar los ácidos orgánicos producidos; determinar la capacidad para producir indoles totales y sideróforos; evaluar la estimulación del crecimiento vegetal en condiciones controladas. Se inocularon por inmersión en las suspensiones bacterianas, propágulos con tres yemas vegetativas. Se plantaron en macetas y se colocaron en invernadero durante 90 días. Los aislados de bacterias se caracterizaron como YM<sub>1</sub>, YM<sub>2</sub> e YM<sub>3</sub> y tales tratamientos solubiliaron fosfato tricálcico, fosfato de hierro y escorias Thomas y produjeron indoles totales y sideróforos. YM<sub>1</sub> e YM<sub>3</sub> mostraron diferencias significativas en longitud de tallo, número de hojas, peso seco de parte aérea, longitud y peso seco de raíces. Los resultados sugieren que estos aislados podrían ser promisorios para su utilización como promotores de crecimiento en yacón.

**Palabras clave:** Rizobacterias; Solubilización de fósforo; Plantas nutraceuticas.

#### Abstract

In recent years, research in plant species for nutraceutical purposes has increased. The biotechnological development allows the use of microorganisms in the production of edible value crops and medicinal properties such as yacón (*Smallanthus sonchifolius*). The aim of this work is to contribute to the knowledge of the association of the bacteria to its rhizosphere and its capacity to promote plant growth. In order to do this, phosphate-solubilizing bacteria were isolated from the yacón rhizosphere. Solubilization index of tricalcium phosphate and the ability to solubilize other phosphates (iron phosphate, aluminum phosphate and basis slag), to produce total indoles and siderophores were evaluated. The organic acids produced were identified and the effect on plant growth was evaluated. Propagules with three vegetative buds were inoculated by immersion in the bacterial suspensions. They were planted in pots and placed in a greenhouse for 90 days. The isolated characterized as YM<sub>1</sub>, YM<sub>2</sub> and YM<sub>3</sub> solubilized tricalcium phosphate, iron phosphate and basis slag. All produced total indoles and siderophores. YM<sub>1</sub> and YM<sub>3</sub> showed significant differences in stem length, number of leaves, dry weight, length and dry weight of roots. The results suggest that these isolated could be promising for their use, as growth promoters, in yacón.

**Keywords:** Rhizobacteria; Phosphorus solubilization; Nutraceutical plants.

#### Introducción

En los últimos años aumentaron las investigaciones en especies vegetales con fines terapéuticos y medicinales. Los productos derivados del yacón,

maca y otros, en forma de suplementos dietéticos, adquieren cada vez mayor relevancia en el circuito productivo.

La región Andina ha sido la cuna de una gran cantidad de plantas con raíces o tubérculos comes-

Recibido 24/07/2018; Aceptado 12/10/2018.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

tibles que fueron utilizados por sus habitantes desde la época precolombina. El yacón [*Smallanthus sonchifolius* (Poeppig) Robinson] pertenece a la familia Asteraceae, y se distribuye desde Estados Unidos hasta el centro-este de Argentina. Actualmente en Argentina crecen en forma natural dos especies de *Smallanthus*: *S. macroscyphus* (Baker) en las Yungas del noroeste y *S. connatus* (Sprengel) en el este de Argentina (Vitali *et al.*, 2015).

Hasta el siglo XX el yacón no era conocido fuera de la región andina, los primeros ensayos agronómicos conocidos en este cultivo fueron realizados en Italia y Alemania durante la segunda guerra mundial, sin grandes logros. En la década del '60 se introdujo en Nueva Zelanda y esto permitió su difusión en el resto del mundo hacia finales del siglo XX. En la década del '80 el cultivo fue llevado a Japón, pasando de allí a Brasil a comienzos de los '90 (Grau *et al.*, 2007).

El yacón es una planta herbácea, erecta, que puede llegar a medir desde 0,7 hasta 2,0 m de altura, produce principalmente raíces reservantes o tuberosas que almacenan azúcares en forma de fructooligosacáridos (FOS), un tipo especial de azúcares con atributos beneficiosos para la salud humana. Estas raíces son los órganos de interés económico (Valderrama Cabrera, 2005). Además de FOS, acumulan potasio, compuestos polifenólicos, sustancias antioxidantes y fitoalexinas (Seminario *et al.*, 2003). Su valor comestible y sus propiedades medicinales transformaron al yacón en un cultivo de importancia y su uso se ha extendido por todo el mundo, con una gran variedad de productos derivados de sus raíces, como harinas, jugos, purés y endulzantes. Las hojas secas se consumen como té, siendo Brasil y Japón los mayores productores del "té de yacón" (Seminario *et al.*, 2003; Choque Delgado *et al.*, 2013).

Por su alto contenido de agua y minerales como el potasio, es un buen rehidratante y promueve la generación de la flora intestinal, por lo que es considerado como un prebiótico y las hojas y raíces son utilizadas en la zona del altiplano por personas que sufren trastornos digestivos, renales y diabetes (Sánchez y Genta, 2007).

La propagación del yacón es predominantemente vegetativa y se realiza a través de las llamadas cepas o coronas, las que se seleccionan después de la cosecha y se cortan en trozos con varias yemas. Para su plantación se prefieren suelos francos, profundos y sueltos con buen contenido de materia orgánica y buen drenaje, priorizando el uso

de abonos como estiércoles, gallinaza, compost y otros para acceder a los mercados de productos orgánicos (Seminario *et al.*, 2003; Valderrama Cabrera, 2005). No es recomendable el uso de fertilizantes químicos porque disminuye la calidad del tubérculo en lo que respecta al dulzor (Álvarez Cajas *et al.*, 2012).

Se reportan investigaciones referidas a las características morfológicas y anatómicas de la planta de yacón (Mercado *et al.*, 2006; Coll-Arároz *et al.*, 2008). En otro sentido, Hurrell *et al.* (2013), analizaron y evidenciaron el carácter nutracéutico y el reciente ingreso al circuito comercial de cinco especies vegetales, entre las que se destacan: *Annona muricata* (L.), como anticancerígeno; *Plukenetia volubilis* (L.) como hipocolesterolémico y *S. sonchifolius* como antidiabético. Martínez Oliveira *et al.* (2016) demostraron los efectos hipolipidémicos y antioxidantes del extracto de raíz en ratas con hipercolesterolemia y Ribeiro Pereira *et al.* (2016) cuantificaron los niveles de fenoles totales, taninos, ácidos fenólicos y actividad antioxidante en la pulpa natural, en la cáscara y en las harinas del yacón.

Como cultivo nuevo para la agronomía y la botánica, en Argentina existen todavía muchos aspectos poco explorados en este cultivo. En la Quebrada de Humahuaca (Jujuy, Argentina) la producción de yacón se realiza en la actualidad con fines comerciales dejando de lado el autoconsumo; el cultivo se realiza en suelos poco desarrollados con fertilización orgánica (Maldonado *et al.*, 2008).

En relación con investigaciones referidas a la microflora asociada al yacón, Moraes *et al.* (2012) realizaron los primeros reportes que muestran que los medios de cultivo autotróficos pueden representar una alternativa viable para el crecimiento de plantas saludables sin la eliminación de las bacterias benéficas asociadas con el huésped. Mercado *et al.* (2013) registraron un alto nivel de colonización (86 %) por hongos micorrícicos arbusculares y Giampaoli *et al.* (2014) determinaron que la esterilización de suelo por métodos físicos disminuyó la colonización micorrícica y la producción de raíces tuberosas.

La industria farmacéutica demanda grandes cantidades de biomasa vegetal para la extracción de compuestos nutracéuticos, por lo que se hace necesario aumentar la producción utilizando técnicas de cultivo que incluyen la aplicación de fertilizantes. La búsqueda de alternativas que ayuden a minimizar el efecto adverso de los fertilizan-

tes químicos es de gran interés hoy en día para la agricultura. En este contexto, los avances de la biotecnología han permitido encontrar soluciones eficaces utilizando microorganismos como una alternativa a la aplicación de fertilizantes minerales. Algunas bacterias asociadas con la rizósfera poseen la capacidad de promover el crecimiento vegetal y se las denomina PGPR [*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, (Kloepper y Schroth, 1978)]. Las PGPR actúan a través de diferentes mecanismos y la respuesta de las plantas se refleja en un mayor desarrollo por la toma de nutrientes, la tolerancia al estrés ambiental, el contenido de clorofila en el área foliar y la buena salud radicular (Pérez-Montano *et al.*, 2014). Entre los mecanismos de promoción del crecimiento se citan la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos y la síntesis de sideróforos y otros compuestos que les permiten actuar como agentes de biocontrol (Singh, 2013). Algunas PGPR presentan la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de compuestos inorgánicos u orgánicos y dentro de este grupo funcional se encuentran las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) que pueden ser de vida libre en el suelo o establecer relaciones simbióticas con algunas plantas. Entre los géneros más significativos de bacterias que solubilizan fosfatos se encuentran *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* y *Herbaspirillum* (Bhattacharyya y Jha, 2012; Estrada *et al.*, 2013).

Las investigaciones han señalado que en la mayoría de las BSF, la capacidad para solubilizar fosfatos está estrechamente vinculada a la producción de ácidos orgánicos, que provienen de la respiración oxidativa o de procesos fermentativos microbianos. Entre los ácidos más estudiados se encuentran el glucónico, 2-cetoglucónico, butírico, oxálico, succínico, málico, acético, láctico, cítrico, fumárico, los cuales actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico (Sashidhar y Podile, 2010; Paredes-Mendoza y Espinoza, 2010; Restrepo-Franco *et al.*, 2014).

Numerosos investigadores han demostrado el potencial biotecnológico de la aplicación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en diferentes cultivos. Entre ellos, Banerjee *et al.* (2010), Cabra Cendales *et al.* (2017) y Nassal *et al.* (2017) en tomate; Viruel *et al.* (2014) y García *et al.* (2015) en maíz; Peralta *et al.* (2014) en ba-

tata; Bueno *et al.* (2016) en tabaco y pimiento y Delaporte-Quintana *et al.* (2017) en frutilla.

Considerando la importancia adquirida por el yacón en los últimos años, el presente trabajo busca contribuir al conocimiento de las bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a la rizosfera y su capacidad para promover el crecimiento vegetal. Para ello se fijaron como objetivos: aislar y caracterizar bacterias solubilizadoras de fosfatos de la rizósfera de yacón; evaluar el índice de solubilización de fosfato tricálcico; comprobar la capacidad de las bacterias para solubilizar otros fosfatos (fosfato de hierro, fosfato de aluminio y Escorias Thomas); identificar los ácidos orgánicos producidos; determinar la capacidad para producir indoles totales y sideróforos; evaluar la estimulación del crecimiento vegetal en condiciones controladas.

## Materiales y métodos

### *Aislamiento y caracterización de bacterias rizosféricas con actividad solubilizadora de fosfatos*

Se tomó una muestra compuesta (constituida por 10 submuestras al azar) de rizósferas de yacón de una colección de plantas del campo experimental de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán. La muestra se secó a temperatura ambiente y se tamizó por malla de 2 mm. Se realizaron diluciones, suspensiones y se sembraron por triplicado en medio de cultivo NBRIP (Nautiyal, 1999). Se incubaron a 28 °C por seis días hasta la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias que indicaron la solubilización. Se realizó la caracterización macro y microscópica de los aislados, tinción de pared celular y pruebas bioquímicas (citocromo oxidasa, catalasa, glucosa, lactosa, citrato, almidón, gelatina, reducción de nitratos). Para estudiar el comportamiento cinético de las bacterias, se realizaron las curvas de crecimiento; se midió la densidad óptica ( $DO_{590nm}$ ) a cada hora, se realizaron diluciones sucesivas que se sembraron en medio TSA por duplicado para el recuento de UFC/ ml (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro).

### *Determinación del índice de solubilización de fosfato tricálcico*

Para la determinación del índice de solubilización de fosfato tricálcico (IS), 5 µl de cada aislado se sembraron por triplicado en cajas de Petri con

medio de cultivo NBRIP y se incubaron a 28 °C durante seis a diez días hasta la aparición de halos transparentes. Se midieron los diámetros de cada colonia y de cada halo en tres direcciones. A partir de los valores promedios se determinó el índice de solubilización, utilizando la siguiente fórmula:

$$IS = (\text{diámetro del halo} + \text{diámetro de la colonia}) / \text{diámetro de la colonia}$$
 (Edi-Premono *et al.*, 1996).

#### *Solubilización de otros fosfatos*

Para evaluar la solubilización de fosfato de hierro, de aluminio y de Escorias Thomas, cada aislado se sembró por triplicado en cajas de Petri con medio de cultivo NBRIP al que se le adicionaron las distintas fuentes de fosfatos. Se incubaron a 28 °C durante seis a diez días y se observó la formación o no de halo de solubilización para hierro y aluminio. El índice de solubilización para Escorias Thomas (mezcla de minerales además de fósforo), se determinó de la misma manera que para el fosfato tricálcico.

#### *Producción de ácidos orgánicos*

La identificación de los ácidos orgánicos producidos por los tres aislados se realizó por HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia). Para ello se tomaron 10 ml de cada suspensión y se incubaron durante cinco días a 28 °C con agitación (150 rpm) en medio NBRIP líquido. Se centrifugaron a 4000 xg y el sobrenadante se analizó en un equipo Knauer Wellchrom con un detector RI (índice de refracción) K-2301, inyección manual Knauer, bomba Smartline Pump 100 y calefactor de columna ZC-90. Se empleó una columna Rezex ROA-Pb2+ con un flujo de 0,6 ml/min a una presión de 10 MPa y temperatura de 25 °C. Los picos correspondientes a cada ácido orgánico fueron detectados e identificados de acuerdo con el tiempo de retención de los estándares comerciales de cada ácido.

#### *Producción de indoles totales*

La determinación de indoles totales se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Glickmann y Dessaux (1995). Cada aislado proveniente de un cultivo de 24 h se transfirió a un medio líquido con: glucosa, 10 g/l;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  2,5 g/l;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/l; KCl 0,2 g/l y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 g/l adicionado con 3 ml de triptófano (Trp) al 0,01 %. Los cultivos se incubaron durante 72 h a 28 °C con agitación y luego

se centrifugaron a 4000 xg durante 10 minutos. A cada sobrenadante se le agregó el mismo volumen del reactivo de Salkowski ( $\text{FeCl}_3$  12,5 g,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7,5 M); la mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos y se determinó la absorbancia a 540 nm. Como estándar se utilizó ácido indol acético (grado p.a.). Los indoles totales se expresaron como ug/mg de proteínas totales, las cuales fueron determinadas por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

#### *Producción de sideróforos*

La producción de sideróforos se evaluó utilizando la técnica universal del Cromo Azurol Sulfonato (CAS) en medio sólido (Schwyn y Neilands, 1987). Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo libre de hierro, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron 5 µl en cajas de Petri con medio de cultivo sólido mezclado con la solución CAS. Se incubaron durante cinco a siete días a 28 °C. La eficiencia de producción de sideróforos (EPS) para cada aislado se calculó con la siguiente fórmula:  $[(D_h - D_c) / D_c] \times 100$ , donde  $D_h$  corresponde al diámetro del halo y  $D_c$  corresponde al diámetro de la colonia.

#### *Evaluación de la promoción del crecimiento vegetal*

Propágulos entre 60 a 80 g con tres yemas vegetativas cada uno, se inocularon por inmersión en las suspensiones bacterianas durante 30 minutos. Las bacterias se hicieron crecer en medio TSC (Tripteína Soja Caldo) durante 12 h a 28 °C y a 150 rpm. Se centrifugaron durante diez minutos a 4000 xg, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en agua destilada estéril hasta obtener las DO correspondientes a  $10^9$  UFC/ml. Los propágulos se plantaron en macetas con un sustrato constituido por suelo y arena (2:1) y se colocaron en invernadero tipo capilla durante 90 días. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos fueron: T1: inoculado con  $\text{YM}_1$ ; T2: inoculado con  $\text{YM}_3$ ; T3: inoculado con  $\text{YM}_4$  y T4: Testigo inoculado con agua destilada estéril.

#### *Variables analizadas*

En la parte aérea se analizaron: altura, número de hojas y peso seco por gravimetría (secado en estufa a 60 °C hasta peso constante). En la raíz se analizaron: longitud y peso seco.

### Análisis de los datos

Se utilizó análisis de la varianza seguido de la prueba LSD de Fisher para detectar diferencias entre medias para los distintos tratamientos. Se trabajó con un nivel de significación del 5 % y se utilizó el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

## Resultados y discusión

### Caracterización de los aislamientos

De la operación de aislamiento y purificación, se obtuvieron tres aislados (YM<sub>1</sub>, YM<sub>3</sub>, YM<sub>4</sub>) con características macroscópicas similares en medio TSA. Se observaron colonias de 2 a 4 mm de diámetro, planas, de forma redonda, lisas y de borde regular. En cuanto a los aspectos morfológicos, todas fueron bacilos móviles, Gram negativas y en la Tabla 1 se registra el comportamiento frente a diferentes sustratos.

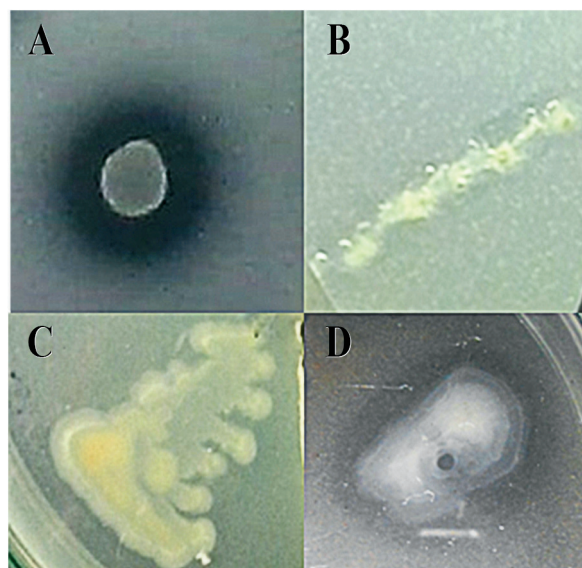
**Tabla 1.** Comportamiento de los aislados de la rizósfera de yacón [*Smilax sitchifolius* (Poeppig) Robinson] frente a diferentes sustratos.

Sustratos	YM <sub>1</sub>	YM <sub>3</sub>	YM <sub>4</sub>
Citocromo oxidasa	-	+	+
Catalasa	+	-	-
Glucosa	+	-	-
Lactosa	+	-	-
Citrato	+	-	-
Almidón	-	+	-
Gelatina	-	-	-
Reducción de nitratos	-	+	-

(+): Reacción positiva; (-): Reacción negativa.

### Índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico

El método semicuantitativo IS permite tener una aproximación de la capacidad solubilizadora de fosfato por parte de un microorganismo (Figura 1A).



**Figura 1.** Solubilización de distintas fuentes de fósforo insoluble por los aislados. A) Fosfato tricálcico (colonia + halo). B) Fosfato de hierro (colonia + halo). C) Fosfato de aluminio (colonia). D) Escorias Thomas (colonia + halo).

De los resultados observados en la Tabla 2, YM<sub>1</sub> presenta el mayor IS (2,49), seguido por YM<sub>3</sub> (1,99) e YM<sub>4</sub> (1,26). Estos valores son similares a los reportados por Angulo *et al.* (2014) quienes obtuvieron IS de 2,0 para *Rahnella aquatilis* y 1,19 para *B. amyloliquefaciens* aisladas de rizósfera de *Eucalyptus nitens* y a los de Babana *et al.* (2013) quienes determinaron el IS de 3,01 para *Agrobacterium tumefaciens/radiobacter* y 1,0 para *Pseudomonas* sp. en rizósfera de trigo. Sin embargo, los valores obtenidos en este trabajo resultaron inferiores a los determinados por Kandjimi *et al.*, (2015) quienes obtuvieron valores de IS entre 2,07 y 12,0 en aislados de la rizósfera de *Tylosema esculentum* y Mardad *et al.* (2013) con IS entre 3,76; 4,14 y 4,4; de aislamientos de un depósito de roca fosfatada.

### Solubilización de otros fosfatos

Los aislados YM<sub>1</sub>, YM<sub>3</sub> e YM<sub>4</sub> presentaron zo-

**Tabla 2.** Solubilización de distintas fuentes de fósforo, producción de indoles (µg indol/ mg de proteína) y de sideróforos (EPS) por los aislados de la rizósfera de yacón (valores promedio ± desvío estándar). (+) presencia de halo; (-) ausencia de halo.

Variable analizada	YM <sub>1</sub>	YM <sub>3</sub>	YM <sub>4</sub>
Solubilización de fosfato de hierro	+	+	+
Solubilización de fosfato de aluminio	-	-	-
Índice de solubilización de fosfato tricálcico	2,49 ± 0,173 a	1,99 ± 0,252 b	1,26 ± 0,064 b
Índice de solubilización de Escorias Thomas	3,01 ± 0,175 a	No solubiliza	3,08 ± 0,420 a
Producción de indoles	0,01 ± 0,001 a	0,0955 ± 0,034 b	0,0264 ± 0,013 a
Eficiencia de producción de sideróforos	12,43 ± 1,729 a	57,5 ± 8,288 b	12,86 ± 1,223 a

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas según prueba LSD de Fisher (p < 0,05).

nas de crecimiento y halos de solubilización en el medio con fosfato de hierro (Figura 1B) y zonas de crecimiento sin formación de halo en el medio con fosfato de aluminio (Figura 1C). La presencia de crecimiento en el medio indicaría que el aluminio fue asimilado por los microorganismos para ser utilizado en sus procesos de biosíntesis. En relación con las Escorias Thomas (Figura 1D), YM<sub>1</sub> presentó un IS de 3,01, YM<sub>4</sub> un IS de 3,08 e YM<sub>3</sub> no mostró signos de solubilización (Tabla 2). Al respecto, Bashan *et al.* (2012) sostienen que la solubilización de fosfato tricálcico, como factor de selección universal, es un rasgo débil y poco fiable. Para que un microorganismo sea considerado solubilizador de fosfato, es necesario comprobar, además, su acción sobre otros fosfatos como el de hierro o aluminio. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten inferir que los tres aislados se comportan como bacterias solubilizadoras de fosfatos.

#### *Producción de ácidos orgánicos*

Los perfiles cromatográficos del estudio por HPLC de los estándares comerciales de ácidos usados y de la presencia de ácidos orgánicos en las muestras evaluadas indicaron que YM<sub>4</sub> tuvo una producción de ácido cítrico de 8,43 g/l. Si bien fue el aislado con menor IS, Fankem *et al.*, (2006) sostienen que la precipitación de citrato de calcio puede impedir la detección de zonas transparentes en las placas con medio de cultivo sólido. La detección del ácido cítrico se corresponde con varios estudios que indican que su síntesis, en conjunto con otros ácidos de bajo número de grupos carboxilos (butírico, oxálico entre otros), está involucrada en la solubilización de minerales de calcio en concentraciones más bajas con respecto a la del ácido glucónico (Scervino *et al.*, 2010). En este sentido Babana *et al.* (2013) aislaron microorganismos de la rizósfera de trigo y demostraron que *Pseudomonas* sp. produjo una concentración de 3,83 g/l de ácido cítrico. Los aislados YM<sub>1</sub> e YM<sub>3</sub>, no mostraron picos de elución correspondiente a los patrones ácidos empleados (oxálico, tartárico, málico, succínico, láctico, fórmico, acético, propiónico, butírico y cítrico) y se observaron picos de elución de naturaleza desconocida. Teniendo en cuenta que estos microorganismos demostraron un buen comportamiento en las pruebas de solubilización *in vitro* de fosfato, alguno de esos picos podría corresponder al ácido glucónico que es el agente más frecuente de solubilización de fosfato,

el cual es producido por *Pseudomonas* sp. y otras bacterias Gram negativas (Song *et al.*, 2008; Mardad *et al.*, 2013).

#### *Producción de indoles totales*

Considerando que la producción de fitohormonas es una de las características más estudiadas en las bacterias promotoras de crecimiento, se evaluó la capacidad de los aislados para producir indoles totales en el medio de cultivo suplementado con triptófano como precursor. Los resultados que se registran en la Tabla 2 evidencian que las tres bacterias analizadas en este trabajo producen indoles. YM<sub>3</sub> produjo 0,0935 µg/mg de proteína, YM<sub>4</sub> 0,0263 µg/mg de proteína e YM<sub>1</sub> 0,010 µg/mg de proteína. En este sentido, Moraes *et al.* (2012) reportaron la producción de indoles de bacterias epífitas y endofíticas asociadas al yacón propagado *in vitro*.

#### *Producción de sideróforos*

El método cualitativo del Cromo Azurol Sulfonato permitió determinar la eficiencia de producción de sideróforos (EPS). Los tres aislados fueron capaces de producir sideróforos YM<sub>3</sub> produjo la mayor EPS (57,5) con respecto a los otros aislados (Tabla 2). Numerosos investigadores han informado acerca de la producción de sideróforos por parte de microorganismos solubilizadores de fosfato, entre otros Panhwar *et al.* (2012) en *Bacillus* sp.; Babana *et al.*, (2013) en *Pseudomonas* sp. y *Agrobacterium* sp.; Angus *et al.* (2013) en varias especies de *Burkholderia* y Sánchez López *et al.* (2014) en *Pseudomonas* sp.

#### *Evaluación de la promoción del crecimiento vegetal*

A los 90 días posteriores a la inoculación de los rizomas y su acondicionamiento en macetas en invernadero, se evaluaron los siguientes parámetros de crecimiento: en la parte aérea se midió altura, número de hojas y peso seco y en la raíz longitud y peso seco (Tabla 3). En la variable longitud de tallo, los tratamientos inoculados presentaron valores significativamente mayores con respecto al testigo. En relación con el número de hojas, todos los tratamientos inoculados mostraron diferencias significativas respecto al testigo y el peso seco de parte aérea, resultó mayor en YM<sub>1</sub> e YM<sub>3</sub> en relación al control (Tabla 3).

Los resultados de longitud y peso de raíz mostraron que las plantas inoculadas con YM<sub>1</sub> e YM<sub>3</sub>

**Tabla 3.** Parámetros de crecimiento analizados de plantas de yacón [*Smallanthus sonchifolius* (Poeppig) Robinson] a los 90 días de inoculación con bacterias (valores promedio  $\pm$  desvío estándar).

Tratamiento	Longitud de tallo (cm)	Número de hojas	Peso seco de parte aérea (g)	Longitud de raíz (cm)	Peso seco de raíz (g)
Inoculado con YM <sub>1</sub>	47,00 $\pm$ 5,29 b	8,00 $\pm$ 1,00 c	2,38 $\pm$ 0,07 c	54,00 $\pm$ 7,55 c	3,49 $\pm$ 1,02 c
Inoculado con YM <sub>3</sub>	42,00 $\pm$ 4,36 b	7,33 $\pm$ 1,15 bc	2,09 $\pm$ 0,17 bc	39,66 $\pm$ 7,37 b	2,50 $\pm$ 0,31 bc
Inoculado con YM <sub>4</sub>	40,67 $\pm$ 7,50 b	6,33 $\pm$ 0,57 b	1,41 $\pm$ 0,44 ab	27,66 $\pm$ 3,21 ab	1,85 $\pm$ 0,24 ab
Testigo	26,67 $\pm$ 1,53 a	3,67 $\pm$ 0,57 a	1,22 $\pm$ 0,08 a	19,66 $\pm$ 6,50 a	1,24 $\pm$ 0,16 a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas según prueba LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ).

presentaron raíces con mayor longitud y peso seco (Tabla 3). Resultados similares fueron encontrados por Lara Mantilla y Negrete Peñata (2015) quienes demostraron, entre otros parámetros analizados, el aumento de la longitud y peso seco de raíces en *Dichanthium aristatum* (pasto *Angleton*) inoculado con un consorcio de *Pantoea* sp. y *Pseudomonas* sp. Igualmente Ávila Martínez *et al.* (2015) informaron que la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus firmus*, de forma individual y como inoculante combinado sobre cultivo de *Baccharis macrantha* (Asteráceas) incrementó el porcentaje de germinación de semillas, altura de plántula, longitud de raíz y el peso seco.

Los resultados encontrados en este trabajo indican que la estimulación del crecimiento sobre el yacón, podría asociarse a un efecto combinado entre los mecanismos de acción (solubilización de fosfatos, producción de indoles y de sideróforos) demostrado por las bacterias analizadas.

## Conclusiones

De las tres bacterias estudiadas, YM<sub>1</sub> e YM<sub>3</sub> tuvieron el mejor comportamiento en las diferentes variables de crecimiento evaluadas (longitud de tallo, número de hojas, peso seco de parte aérea, longitud y peso seco de raíces), por lo que resultan promisorias para su utilización como promotoras de crecimiento en el cultivo de yacón.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por PIUNT A 621.

## Referencias bibliográficas

Álvarez Cajas G., Sánchez Oviedo S.P., Paredes Y.J. (2012). Manual Técnico para el cultivo de Jícama (*Smallanthus sonchifolius*) en Loja. Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

Angulo V.C., Sanfuentes E.A., Rodríguez F., Sossa K.E. (2014). Caracterización de rizobacterias pro-

motoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de Microbiología 46 (4): 338-347.

Angus A.A., Lee A., Lum M.R., Shehayeb M., Hessabi R., Fujishige N.A., De Los Santos P.E. (2013). Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*; a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium; are influenced by environmental factors. Plant and Soil 369 (1-2): 543-562.

Ávila Martínez E.G., Lizarazo Forero L.M., Cortés Pérez F. (2015). Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizósfera. Acta Biológica Colombiana 20 (3): 121-131.

Babana A.H., Dicko A.H., Maïga K., Traoré D. (2013). Characterization of rock phosphate-solubilizing microorganisms isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere in Mali. Journal of Microbiology and Microbial Research 1 (1): 1-6.

Banerjee S., Palit R., Sengupta C., Standing D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. Australian Journal of Crop Science 4 (6): 378-383.

Bashan Y., Kamnev A.A., de-Bashan L.E. (2012). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biology and Fertility of Soils 49: 465-479.

Bhattacharyya P.N., Jha D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28 (4): 1327-1350.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Buono N.I., Ulla E.L. (2016). Efectos de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annum* L.) en condiciones controladas. Revista Agronómica del Noroeste Argentino 36 (2): 45-54.

Cabra Cendales T., Rodríguez González C.A., Villota Cuásquer C.P., Tapasco Alzate O.A., Hernández Ro-

- dríguez A. (2017). *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Biológica Colombiana* 22 (1): 37-44.
- Choque Delgado G.T., da Silva Cunha Tamashiro W.M., Maróstica Junior M.R., Pastore G.M. (2013). Yacón (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. *Plant Foods for Human Nutrition* 68: 222-228.
- Coll Araoz M.V., Mercado M.I., Grau A., Ponessa G.I. (2008). Morfología y anatomía foliar; caulinar y radicular de *Smallanthus macroscyphus* (Asteraceae). *Lilloa* 45 (1-2): 23-33.
- Delaporte-Quintana P., Grillo-Puertas M., Lovaisa N.C., Teixeira K.T., Rapisarda V.A., Pedraza R.O. (2017). Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition in strawberry plants. *Plant and Soil* 419: 335-347.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo Y.C. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat; FCA; Universidad Nacional de Córdoba; Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Edi-Premono M., Moawad A.M., Vlek P.L.G. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 11: 13-23.
- Estrada G.A., Divan Baldani V.L., Messias de Oliveira D., Urquiaga S., Baldani J.I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil* 369: 115-129.
- Fankem H., Nwaga D., Deubel A., Dieng L., Merbach W., Etoa F.X. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology* 5 (24): 2450-2460.
- García R.A., Lovaisa N.C., Ulla E.L. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 35 (1): 13-28.
- Giampaoli G., Brandán de Weht C.I., Enrico R.J., Coll Aráoz M.V., Lencina V. (2014). Efecto de la esterilización con métodos físicos en suelo; sobre la flora micorrízica y en el cultivo del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en Horco Molle, Tucumán. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 34 (2): 36-37.
- Glickmann E., Dessaux Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2): 793-796.
- Grau A., Kortsarz A.M., Sánchez S.S., Genta S., Catalán C.A., Perdígón G. (2007). El yacón como alimento, fuente de suplementos dietarios y de productos farmacéuticos: un panorama histórico, el presente y el futuro. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6 (5): 173-174.
- Hurrell J., Pochettino M., Puentes J., Arenas P. (2013). Del marco tradicional al escenario urbano: Plantas ancestrales devenidas suplementos dietéticos en la conurbación Buenos Aires-La Plata, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12 (5): 499-515.
- Kandjimi O.S., Uzabakiriho J., Chimwamurombe P.M. (2015). Isolation and characterization of culturable bacteria from bulk soil samples and the rhizosphere of arid-adapted *Tylosema esculentum* (Burchell). A. Schreiber (Marama bean) in Namibia. *African Journal of Biotechnology* 14 (11): 944-952.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, Institut National de le Recherche Agronomique 2: 879-882.
- Lara Mantilla C., Negrete Peñata J.L. (2015). Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 17 (1): 122-130.
- Maldonado S., Luna Pizarro P., Martínez V., Villatarco M., Singh J. (2008). Producción y comercialización de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en comunidades rurales del Noroeste argentino. *Agroalimentaria* 13 (26): 119-125.
- Mardad I., Serrano A., Soukri A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research* 7 (8): 626-635.
- Martínez Oliveira P., Coelho R.P., Pilar B.C., Golke A.M., Güllich A.A., da Costa Escobar Piccoli J., Manfredini V. (2016). Supplementation with the yacón root extract (*Smallanthus sonchifolius*) improves lipid, glycemic profile and antioxidant parameters in wistar rats hypercholesterolemic. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (9): 2284-2300.
- Mercado M.I., Coll Aráoz M.V., Brandán de Weht C.I., Ponessa G.I., Grau A. (2013). Arbuscular mycorrhizal associations and dark septate endophytes in yacón (*Smallanthus sonchifolius*) and a wild relative (*Smallanthus macroscyphus*). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 48 (2): 193-200.
- Mercado M.I., Ponessa G.I., Grau A. (2006). Morfología y anatomía foliar de "Yacón", *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), con fines de control de calidad. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25 (4): 526-532.
- Moraes R.M., Melo I.S., Sumyanto J., Chandra S., Joshi V. (2012). Bacterial community associated with autotrophic and heterotrophic cultures of medicinal plant *Smallanthus sonchifolius* (yacón). *American*

- Journal of Plant Sciences 3: 1382-1389.
- Nassal D., Spohn M., Eltlbany N., Jacquiod S., Smaila K., Marhan S., Kandeler E. (2018). Effects of phosphorus-mobilizing bacteria on tomato growth and soil microbial activity. *Plant and Soil* 427 (1-2): 17-37.
- Nautiyal C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-70.
- Panhwar Q.A., Othman R., Rahman Z.A., Meon S., Ismail M.R. (2012). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. *African Journal of Biotechnology* 11 (11): 2711-2719.
- Paredes-Mendoza M., Espinosa V.D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28 (1): 61-70.
- Peralta J.M., Ulla E.L., Zamudio N.M., Borioni R.H. (2014). Rizobacterias solubilizadoras de fosfatos inoculadas en dos cvs. de batata (*Ipomoea batatas* L. (Lam)). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 34 (2): 169-171.
- Restrepo-Franco G.M., Marulanda-Moreno S., de la Fe-Pérez Y., Díaz-de la Osa A., Baldani V.L., Hernández-Rodríguez A. (2014). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 46 (1): 63-76.
- Ribeiro Pereira J.A., CarvalhoTeixeira M., Saczk A.A., Piccolo Barcelos M.F., Firmino de Oliveira M., de Abreu W.C. (2016). Total antioxidant activity of yacon tubers cultivated in Brazil. *Ciência e Agrotecnologia* 40 (5): 596-605.
- Sánchez López D.B., García Hoyos A.M., Romero Perdomo F.A., Bonilla Buitrago R.R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 122-128.
- Sánchez S., Genta S. (2007). Yacón: un potencial producto natural para el tratamiento de la diabetes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6 (5): 162-164.
- Sashidhar B., Podile A.R. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1-12.
- Scervino M., Prieto M., Ivana M., Recchi M., Sarmiento N., Godeas A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils* 46: 755-763.
- Schwyn B., Neilands J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Seminario J., Valderrama M., Manrique I. (2003). El yacón: Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la Papa (CIP). Universidad Nacional de Cajamarca y Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (CO-SUDE), Perú.
- Singh J. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria. *Resonance* 18: 275-281.
- Song O.R., Lee S.J., Lee Y.S., Lee S.C., Kim K.K., Choi L.Y. (2008). Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 151-156.
- Valderrama Cabrera M. (2005). Manual del cultivo de yacón. Programa PYMAGROS (Convenio COSUDE – MINAG), Perú.
- Viruel E., Erazzú L.E., Martínez Calsina L., Ferrero M.A., Lucca M.E., Siñeriz F. (2014). Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14 (4): 819-831.
- Vitali M.S., Katinas L. (2015). Modelado de distribución de las especies argentinas de *Smallanthus* (Asteraceae), el género del yacón: un cultivo potencial para la agricultura familiar. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata* 114 (1): 110-121.