

Artículo científico

Microorganismos solubilizadores de fosfato en dos regiones agroecológicas de la provincia de Tucumán

J.E. Brito y E.L. Ulla*

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

* Autor de correspondencia: elsaula@hotmail.com

Resumen

El interés mundial en desarrollar una agricultura sostenible, se busca reemplazar los fertilizantes químicos por microorganismos con características promotoras del crecimiento vegetal. Los microorganismos solubilizadores de fosfatos presentan una amplia diversidad morfofisiológica y desempeñan un importante papel en el suplemento de fósforo para las plantas; por lo tanto, es de interés la selección de cepas nativas a los fines de optimizar el aporte biológico de fósforo. El objetivo general de este trabajo fue estudiar la actividad de los microorganismos solubilizadores de fosfatos en dos regiones agroecológicas de la provincia de Tucumán. Como objetivos específicos se plantearon: determinar la presencia, aislar, evaluar la eficiencia de solubilización y caracterizar los microorganismos solubilizadores de fosfatos. Se tomaron muestras compuestas de rizósfera de soja (*Glicine max* L. Merr.) de dos regiones agroecológicas de Tucumán. Se realizaron análisis físico-químicos de los suelos, y la presencia y recuento de los microorganismos solubilizadores de fosfatos se realizó por la técnica de dilución en placa en medio de cultivo NBRIP. Se seleccionaron las colonias que presentaron halo de solubilización y se purificaron en medio de cultivo TSA para la caracterización de morfología, motilidad, reacción de Gram y eficiencia de solubilización. Se realizaron las pruebas bioquímicas de: hidrólisis de almidón y gelatina, catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa y lactosa, citrato, ureasa, producción de pigmentos difusibles, sideróforos e indoles. Los aislamientos se caracterizaron como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. y *Serratia* spp. y podrían resultar promisorios para ser usados como promotores del crecimiento vegetal.

Palabras clave: solubilización de fosfatos, bacterias, rizósfera, soja.

Abstract

The urgent need for sustainable and low environmental impact strategies in agriculture requires the development of microbial preparations that improve plant nutrition. Phosphate solubilizing microorganisms are ubiquitous in soils and could play an important role in supplying phosphorus to plants. Isolation of indigenous microflora is an important procedure to optimize the biological contribution of phosphorus. The aim of this work was to study the activity of phosphate solubilizing microorganisms in two agro ecological areas of the province of Tucumán. Other objectives were to determine presence, to isolate, to evaluate solubilization efficiency and to characterize the phosphate solubilizing microorganisms. Rhizospheric soil samples of soybean (*Glicine max* L. Merr.) were collected from two agro ecological areas of Tucumán. Physical and chemical analyses of soil were performed and the presence and counting of phosphate solubilizing microorganisms was conducted by the plate dilution technique in NBRIP medium. Strains that showed solubilization halo were selected and purified on TSA medium. In order to determine the phenotypic diversity, bacteria characterization was done on the basis of morphology, motility, Gram's reaction, solubilization efficiency, hydrolysis of starch and gelatin, catalase, oxidase, glucose and lactose fermentation, citrate, urease, diffusible pigment production, siderophores and indoles production. The isolates were characterized as *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. and *Serratia* spp. that could be used as plant growth promoting rhizobacteria.

Keywords: phosphate solubilization, bacteria, rhizosphere, soybean.

Introducción

El fósforo es un nutriente esencial, absorbido por los seres vivos como fosfato soluble en agua (HPO_4^{-2} o $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$). Participa en la constitución de componentes celulares como ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolípidos, fosfoproteínas y forma parte en reacciones metabólicas vitales, como respiración y síntesis de proteínas (Tate, 1984).

Existen dos formas de fósforo en el suelo: fosfatos orgánicos e inorgánicos (Black, 1975). Las formas orgánicas provienen de residuos vegetales, animales, microorganismos y de residuos urbanos (Cross y Schlessinger, 1995). La mayoría son ésteres de ácido ortofosfórico y han sido identificados como inositol fosfato, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Tisdale *et al.*, 1993; Sylvia *et al.*, 2005). El fósforo inorgánico incluye dos

grupos, por un lado los que contienen hierro y aluminio y por otro lado, los que contienen calcio. Los primeros predominan en suelos ácidos, ya que el fósforo soluble precipita como fosfato de hierro (estregita) y como fosfato de aluminio (variscita). Los que contienen calcio, son más solubles y tienden a desaparecer en suelos ácidos, pero no en suelos alcalinos (Epple, 2000).

Los microorganismos realizan algunas transformaciones de los compuestos orgánicos e inorgánicos del fósforo (Alexander, 1987), lo que representa una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible en el suelo para las plantas (Illmer y Schinner, 1992).

Las rizobacterias estimulan el crecimiento de las plantas y son generalmente denominadas, rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas o PGPR "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (Davison, 1988; Kloepper *et al.*, 1989). El término rizobacterias se refiere a la capacidad de dichos microorganismos para colonizar preferencialmente las interfases suelo-raíz (Kloepper *et al.*, 1991; Barea *et al.*, 2008).

Entre las rizobacterias se pueden encontrar especies que pertenecen a los géneros: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia* y *Rhizobium* (Burdman *et al.*, 1998). Entre los mecanismos por los cuales las PGPR promueven el crecimiento de las plantas se pueden mencionar: producción de fitohormonas (Patten y Glick, 1996; Shaharoon, 2006; Egamberdiyeva, 2007), fijación biológica de nitrógeno (Haahtela, 1985; Roper y Ladha, 1995; Salantur *et al.*, 2006), producción de sideróforos (Cox *et al.* 1981; Shah *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 2009), síntesis de antibióticos, enzimas y/o de compuestos antifúngicos (Bharathi *et al.*, 2004; Jeun *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2006) y la solubilización de nutrientes, principalmente la de fosfatos (Kloepper *et al.*, 1989; Cattelan *et al.*, 1999).

Se han reportado incrementos significativos en el crecimiento y rendimientos de numerosos cultivos de importancia agronómica, en respuesta a la inoculación con PGPR (Biswas *et al.*, 2000; Asghar *et al.*, 2002; Bashan *et al.*, 2004). La aplicación de este tipo de rizobacterias ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas. Se observó un incremento en la emergencia, vigor, biomasa, desarrollo en sistemas radicales y aumentos de hasta un 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como sorgo (Raju *et al.*, 1999; Vikram, 2007), tomate (Siddiqui y Shaukat, 2002; Gravel *et al.*, 2007), maíz (Hebbbar *et al.*, 1998; Kozdroja *et al.*, 2004), trigo (Germida y Siciliano, 2001; Ozturk

et al., 2003; Khalid *et al.*, 2004) y distintos granos (Dobbelaere *et al.*, 2001).

Existen microorganismos que solubilizan el fosfato insoluble a través de diferentes mecanismos, como la producción de ácidos orgánicos, de fosfatasas y quelación e intercambio de reacciones (Johnson y Loeppert, 2006; Onthong *et al.*, 2007). La solubilización del fósforo inorgánico por microorganismos del suelo ha sido estudiada por numerosos investigadores, quienes postularon diversos mecanismos para explicar este fenómeno. La capacidad solubilizadora está frecuentemente asociada a la producción de ácidos, es decir, con la disminución del pH del medio se produce un aumento en la solubilización del fósforo (Miknova y Kubat, 1994; Kim *et al.*, 1997).

Los microorganismos pueden liberar diferentes tipos de ácidos orgánicos, como ácido glicólico, ácido 2-ceto glucónico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido succínico y ácido tartárico (Lapeyrie *et al.*, 1991; Cunningham y Kuiack, 1992). Sin embargo, la producción de ácidos orgánicos y metabolitos varía con las condiciones del medio, estado fisiológico y tipo de microorganismo. Maxwell y Bateman (1968) observaron que la composición del medio afecta el crecimiento y la producción de ácidos. Los ácidos orgánicos producidos en la rizósfera, probablemente no permanezcan intactos por bastante tiempo, como para afectar la mayor parte de fósforo liberado desde el suelo. Sin embargo, es posible que la reducción del pH de la rizósfera y la complejización de cationes produzcan una efectiva solubilización del fósforo, aumentando su incorporación por las raíces de las plantas (Whitelaw, 2000).

La población de microorganismos solubilizadores de fósforo varía de 10^5 a 10^6 células por gramo de suelo seco en leguminosas forrajeras y de 10^3 a 10^6 en gramíneas forrajeras (Barotti e Nahas, 2000). Kumar *et al.* (2001) señalaron que ciertas bacterias y hongos pueden solubilizar *in vitro* fosfatos insolubles en cantidades superiores a sus demandas. Los géneros de bacterias tales como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina* y *Serratia* (Taha *et al.*, 1969; Banik y Dey, 1982; Illmer y Schinner, 1992) y hongos como *Penicillium*, *Sclerotium*, *Aspergillus*, son efectivos en esta conversión (Alexander, 1987).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato desarrollan un papel fundamental en la movilización de este elemento en el suelo (Chen *et al.*, 2006), ya que una insuficiencia de fósforo, puede retrasar la cosecha e influir en la madurez y el desarrollo de la planta, disminuyendo el rendimien-

to del cultivo (Kobus, 1962). Numerosas investigaciones han demostrado que los solubilizadores de fósforo inorgánico están más concentrados en la rizósfera que en el resto del suelo (Hernández *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004). A su vez, es de destacar que existe una mayor habilidad para solubilizar fosfato tricálcico en los hongos, con respecto a las bacterias (Kucey, 1983); esto sugiere la posibilidad de su empleo como inóculos para suelos ácidos (Gómez-Guiñán y Zabala, 2001).

El estudio de estos microorganismos ha sido de gran interés en diferentes países como Canadá, en donde se realizaron aislamientos en rizósfera de canola, trigo, cebada y maíz (de Freitas *et al.*, 1997); India, donde se aislaron microorganismos de suelos alcalinos (Nautiyal, 1999); Colombia, donde se trabajó con microorganismos solubilizadores obtenidos de la rizósfera de arroz (Torres *et al.*, 2000); España, donde se utilizaron hongos del género *Aspergillus* y bacterias de la familia Enterobacteriaceae obtenidos de la rizósfera de maíz (Souchie *et al.*, 2005). En todos los casos, se observaron resultados favorables en el rendimiento de la producción de los cultivos mencionados.

En Argentina se destacan los resultados de tres años de ensayos llevados a cabo por el INTA Pergamino (INTA, 2004). Fernández *et al.* (2005) aislaron microorganismos de suelo rizosférico de Pergamino (Buenos Aires) y Manfredi (Córdoba), encontrando solubilizadores de fosfatos seleccionados a partir de halos de solubilización que se formaron en el medio de cultivo NBRIP.

En la región Noroeste de Argentina se registró la presencia de microorganismos solubilizadores de fosfatos en diferentes cultivos y suelos (Ulla *et al.*, 2006; 2007). En la provincia de Tucumán, en investigaciones realizadas en caña de azúcar, se encontró que dos cepas solubilizadoras de fosfatos producían incrementos en el sistema radicular (González Bournonville, 2008). En ensayos realizados en arroz inoculado con un producto comercial de microorganismos solubilizadores de fosfatos, se determinó un aumento en los parámetros de rendimiento (Mazza *et al.*, 2009).

Existen diferentes métodos para seleccionar microorganismos solubilizadores de compuestos de fósforo inorgánico. Se ha demostrado que la selección, a partir de la formación del halo de solubilización, no es una técnica infalible (Nautiyal, 1999), como tampoco lo es la concentración de fósforo detectada en cultivos líquidos (Rodríguez y Fraga, 1999). Gyaneshwar *et al.* (1998) demostraron que algunos microorganismos que solubilizan fósforo, en condiciones de laboratorio, no son capaces de hacerlo en suelos vertisoles alcalinos. Esta incapacidad se debe, posiblemente, al

alto poder de resistencia a los cambios de pH de los suelos alcalinos junto con la baja secreción de ácidos orgánicos, por parte de los microorganismos en esos ambientes. Estos investigadores determinaron que es mejor adoptar técnicas de selección de cepas a partir de ensayos que reflejen la capacidad amortiguadora de pH del suelo. De este modo, serían válidos sólo aquellos métodos que incorporen soluciones tamponadas a los medios de cultivo.

Debido al creciente interés mundial en desarrollar una agricultura sostenible, actualmente se busca reemplazar los fertilizantes químicos por microorganismos con características promotoras del crecimiento de las plantas (Carcaño *et al.*, 2006). Esto permitiría la utilización de un proceso biotecnológico amigable con el medio ambiente y la eliminación de problemas de contaminación de suelos y napas freáticas, con posteriores problemas de eutrofización en aguas superficiales y contaminación de cursos de agua para el consumo (Motok *et al.*, 2006).

En los últimos años, las investigaciones han centrado su atención en ciertas especies bacterianas promisorias que habitan la rizósfera, el área del suelo que rodea las raíces de las plantas (Okon y Vanderleyden, 1997). Se busca cultivar el suelo conservando al máximo la calidad medio ambiental, permitiendo ingresos adecuados a los agricultores y generando suficientes alimentos a los consumidores, con el fin de preservar y regenerar los recursos naturales y producir alimentos sanos y seguros (Benbrook, 1999). Para poder implementar este tipo de agricultura sostenible, es necesario hallar novedosas soluciones que faciliten el crecimiento de las plantas, tratando de aliviar la carga impuesta a nuestro medio ambiente (Bonilla *et al.*, 2000).

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos presentan una amplia diversidad morfofisiológica y desempeñan un importante papel en el suplemento de fósforo para las plantas. Es de interés la selección de cepas nativas, a los fines de optimizar el aporte biológico de fósforo al suelo. El objetivo general de este trabajo fue estudiar la actividad de los microorganismos solubilizadores de fosfatos en dos regiones agroecológicas de la provincia de Tucumán, y como objetivos específicos se plantearon: determinar la presencia, aislar, evaluar la eficiencia de solubilización y caracterizar los microorganismos solubilizadores de fosfatos.

Materiales y métodos

Se tomaron muestras compuestas de suelo de la rizósfera de soja (*Glicine max* L. Merr.) de

dos explotaciones agrícolas en la provincia de Tucumán. Una ubicada en El Manantial (M), correspondiente a la región Pedemonte Húmedo y Perhúmedo; y otra en Estación Aráoz (E), que corresponde a la región Llanura Chaco Pampeana Semiárida de acuerdo al bosquejo agrológico de Zucardi y Fadda (1985).

Una parte se envió al Laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía y Zootecnia (FAZ) para los análisis físico-químicos, donde se realizaron las siguientes determinaciones: pH (agua 1:2,5); conductividad eléctrica (dS/m); materia orgánica (%); nitrógeno total (%) y fósforo asimilable (ppm Bray I). Una segunda parte, se usó para el aislamiento y recuento de los microorganismos solubilizadores de fosfatos por la técnica de dilución en placa. Las diluciones se sembraron en medio de cultivo NBRIP (Nautiyal, 1999) y se incubaron en estufa a 28°C hasta la aparición de halos claros de solubilización de fósforo alrededor de las colonias.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statistix (Analitical software, 1996). La dispersión de los datos respecto a la media se analizó con ANOVA y para el estudio de la media aritmética se realizó la prueba de las mínimas diferencias significativas (MDS $p \leq 0,05$). Se seleccionaron las colonias predominantes y se purificaron en medio de cultivo TSA. Se determinó la eficiencia de solubilización (ES) de acuerdo a lo descrito por El-komy (2005), donde $ES = \text{diámetro del halo} \times 100 / \text{diámetro de la colonia}$. El diseño experimental y el análisis estadístico se realizaron con tres repeticiones por cada nivel del factor en estudio (aislamientos de cepas solubilizadoras de fósforo). Los resultados se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de efectos fijos. Para medir el efecto del factor en todos los grupos, se eligió la variable de respuesta: eficiencia de solubilización. Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$), las medias se contrastaron utilizando la prueba de Mínima Diferencia Significativa (MDS) y las comparaciones gráficas sugeridas por Gabriel. Los análisis estadísticos se hicieron en el paquete SPSS (SPSS, 2005). Se caracterizaron aquellos microorganismos que presentaron ES superior a 100, a través de microscopía y propiedades bioquímicas, según el Manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

Se determinó morfología, motilidad y tinción de pared celular (Bartholomew, 1962) mediante observación en microscopio óptico y se realizaron las pruebas de hidrólisis de almidón y gelatina (Avendeño *et al.*, 1984), fermentación de glucosa (Rojo de Metilo y Voges-Proskauer) y lactosa, actividad catalasa y oxidasa, pruebas del

citrato, ureasa, producción de pigmentos difusibles (King *et al.*, 1954), producción de sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987) e indoles (Torres *et al.*, 2000).

Resultados y discusión

Los resultados de los análisis físico-químico del suelo rizosférico, realizado en el Laboratorio de Suelos de la FAZ, se muestran en la Tabla 1. Allí se puede observar que los parámetros analizados son ligeramente superiores en los suelos de El Manantial, excepto el pH y conductividad. Los valores de pH encontrados en los suelos de Estación Aráoz y El Manantial, favorecerían las formas de fósforo solubles en concordancia con lo expuesto por Sylvia *et al.* (2005).

Tabla 1. Características físico-químicas de las muestras de suelo obtenidas de El Manantial y Estación Aráoz, Tucumán, Argentina.

Característica	El Manantial	Estación Aráoz
pH	6,3	6,9
Conductividad eléctrica (dS/m)	0,35	0,8
Materia orgánica (%)	2,67	1,83
Nitrógeno total (%)	0,11	0,09
Fósforo asimilable (ppm)	11,1	8,02

Los resultados del recuento y aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfatos se muestran en las Figuras 1 y 2. Del análisis estadístico surge que no existen diferencias significativas en cuanto al número de microorganismos encontrados en las dos localidades. Sin embargo, se puede observar un ligero aumento en Estación Aráoz, esta variabilidad puede responder a múltiples causas. Kucey (1983) señaló que la variación en la cantidad de solubilizadores de fosfatos puede deberse al clima y a la historia de cultivo y del suelo. A la vez, Kobus (1962) estableció que la diferencia en el número de microorganismos solubilizadores está influenciada por el tipo de suelo y los cultivos, más que por las características físicas y químicas del mismo. Sin embargo, es importante remarcar que el método de enumeración utilizado por cada investigador, también podría ser causa de variabilidad (Kucey, 1983). Las UFC g^{-1} suelo de las muestras bajo estudio fueron elevadas con respecto a los valores hallados por Fernández *et al.* (2005). Sin embargo, se encuentran dentro de los rangos descritos por Barotti y Nahas (2000), quienes además postulan que en tales condiciones, podrían realizarse mayores transformaciones de elementos químicos del suelo como mineralización, inmovilización

de minerales y solubilización de fosfatos, favoreciendo de esta manera al desarrollo de la planta, produciendo sustancias estimulantes del crecimiento y contribuyendo a una estructura estable de suelo.

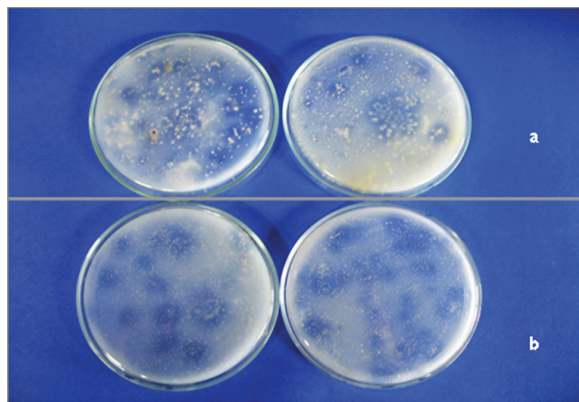


Fig. 1. Microorganismos solubilizadores de fosfatos en medio de cultivo NBRIP. a) El Manantial, b) Estación Aráoz. 2010.

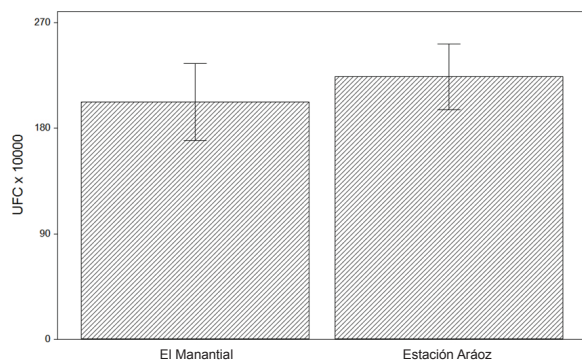


Fig. 2. Recuento de microorganismos solubilizadores de fosfatos.

Los resultados de las observaciones microscópicas de los distintos aislamientos pueden observarse en la Tabla 2. En todos los casos las colonias aisladas presentaron forma bacilar; solo una cepa no tuvo movimiento (M9) y dos fueron Gram positivas (E1 y E7).

La determinación de la eficiencia de solubilización se observa en la Figura 3. En la gráfica de Gabriel (Figura 4) puede observarse que los aislamientos E3, M8, M9 y M14 presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al resto, y a su vez, estos aislamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos. En investigaciones realizadas por El-Komy (2005), el valor más alto encontrado (350), correspondió a *Pseudomonas fluorescens*. Valores superiores a 100 también fueron encontrados por Gómez-Guiñán y Zabala (2001) quienes obtuvieron valores máximos para *Penicillium* y *Aspergillus* de 119,5 y 110,5, respectivamente.

Tabla 2. Movilidad y forma celular de los aislamientos bajo estudio.

Aislamiento	Movilidad	Forma	Tinción de Gram
E1	+	Bacilo	+
E2	+	Bacilo	-
E3	+	Bacilo	-
E4	+	Bacilo	-
E5	+	Bacilo	-
E6	+	Bacilo	-
E7	+	Bacilo	+
M8	+	Bacilo	-
M9	-	Bacilo	-
M10	+	Bacilo	-
M11	+	Bacilo	-
M12	+	Bacilo	-
M13	+	Bacilo	-
M14	+	Bacilo	-

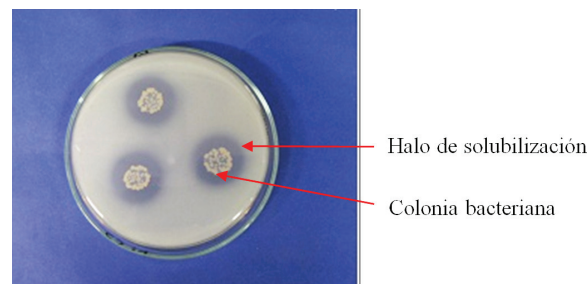


Fig. 3. Colonias de los microorganismos y halos de solubilización en medio de cultivo NBRIP.

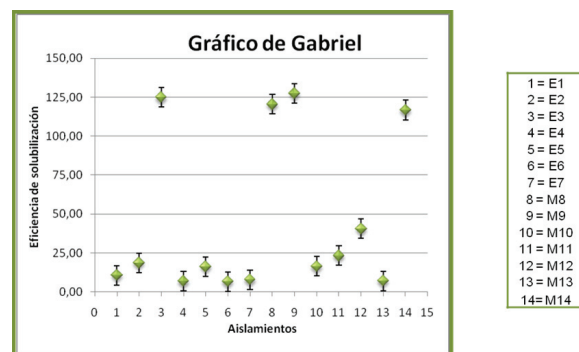


Fig. 4. Eficiencia de solubilización de los aislamientos.

En este trabajo el criterio que se empleó para la determinación de la ES fue el desarrollado por El-komy (2005), el cual se seleccionó por su sencillez y bajo costo. Sin embargo, Nautiyal (1999) sugiere que dicha técnica no es efectiva en su totalidad. Los resultados muestran que del total de microorganismos aislados, solo un 28,57 % resultaron tener un valor superior a 100 (Figura 5). De ellos, tres correspondieron a El Manantial (M8, M9 y M14) y uno a Estación Aráoz (E3). Las siguientes pruebas se realizaron sobre estos aislamientos.

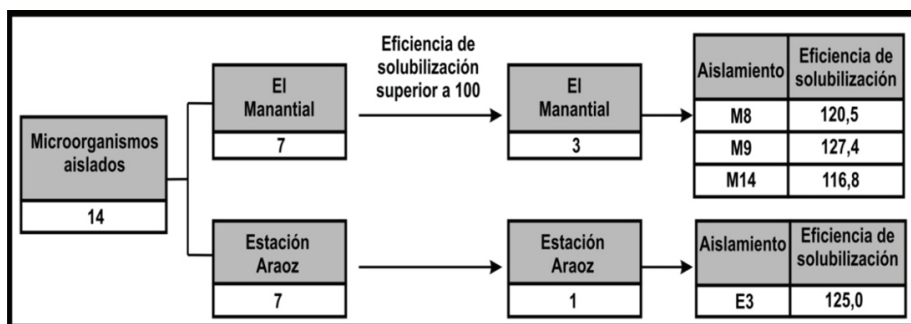


Fig. 5. Número de microorganismos aislados y criterio de selección de bacterias cuya eficiencia de solubilización es superior a 100.

Los resultados obtenidos en las pruebas de hidrólisis de almidón e hidrólisis de gelatina se muestran en la Tabla 3. En ella se observa que los aislamientos E3 y M8 no hidrolizaron el almidón y M9 y M14 hidrolizaron tanto el almidón como la gelatina.

Tabla 3. Hidrólisis de almidón e hidrólisis de gelatina.

Aislamiento	E3	M8	M9	M14
Hidrólisis de almidón	-	-	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+	+

Los resultados que evidencian la fermentación de glucosa y lactosa de los cuatro aislamientos se registran en la Tabla 4. Del análisis de los resultados se desprende que M9 presenta fermentación ácido mixta y M14 fermentación butilenglicólica y ambas fermentan lactosa.

Tabla 4. Pruebas de fermentación de glucosa (Rojo de Metilo y Voges-Proskauer) y de lactosa.

Aislamiento	E3	M8	M9	M14
Rojo de Metilo	-	-	+	-
Voges-Proskauer	-	-	-	+
Lactosa	-	-	+	+

La evaluación de la presencia de las enzimas citocromo oxidasa y catalasa se pueden ver en la Tabla 6; en todos los casos se observó actividad catalasa positiva, y en referencia a la actividad oxidasa, M14 y E3 fueron positivos.

La capacidad de los aislamientos para utilizar el citrato como única fuente de carbono y la presencia-ausencia de la enzima ureasa en los aislamientos, se observa en la tabla 5; solo M9 no fue capaz de utilizar esta fuente carbonada.

Los resultados de la determinación de pigmen-

tos difusibles se muestran en la Tabla 7. M3 produjo pigmentos tipo piocianina y fluoresceína y E3 tipo fluoresceína; los aislamientos M9 y M14 no produjeron pigmentos.

Tabla 5. Actividad oxidasa y catalasa.

Aislamiento	E3	M8	M9	M14
Actividad catalasa	+	+	+	+
Actividad Oxidasa	+	+	-	-

Tabla 6. Utilización de citrato como única fuente de carbono y presencia-ausencia de la enzima ureasa.

Aislamiento	E3	M8	M9	M14
Citrato	+	+	-	+
Ureasa	-	-	+	-

Tabla 7. Producción de pigmentos difusibles en medios de cultivo King A y King B.

Aislamiento	E3	M8	M9	M14
King A (Piocianina)	-	+	-	-
King B (Fluoresceína)	+	+	-	-

De acuerdo a las pruebas realizadas, siguiendo los lineamientos del Manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994), el aislamiento E3 se caracterizó como *Pseudomonas fluorescens*, el M8 como *Pseudomonas aeruginosa*, M9 como *Klebsiella* spp. y M14 como *Serratia* spp. Se conoce que tanto *Serratia* como *Klebsiella* habitan el suelo en la región rizosférica y pueden solubilizar fósforo inorgánico en cantidades superiores a sus demandas (Taha *et al.* 1969; Banik y Dey 1982; Illmer y Schinner, 1992; Burdman *et al.*, 1998).

La producción de sideróforos evaluada en este trabajo se muestra en la Tabla 8. El empleo del

cromo azurol sulfonato (Schwyn y Neilands, 1987), conocido como un ensayo universal para la detección de sideróforos, permitió establecer y confirmar que los cuatro aislamientos bajo estudio son productores de sideróforos. E3 produjo sideróforos al igual que lo demostrado por Hernández *et al* (2004); M8 en coincidencia con lo descrito por Cox *et al.* (1981) y M14 de manera similar a lo demostrado por Fang *et al.* (2009) en aislamientos obtenidos de rizósfera de tabaco. M9 produjo sideróforos en concordancia a los resultados obtenidos por Carcaño *et al.* (2006). Como otras rizobacterias, no son agentes de control biológico típicas, sin embargo, pueden considerarse como microorganismos capaces de multiplicarse para formar grandes poblaciones en determinadas condiciones, o por preferencia de algunos sustratos, por lo que podrían desplazar a otros microorganismos, dentro de ellos a algunos patógenos y, en este proceso, reducir la severidad de la enfermedad y mejorar el crecimiento de la planta.

Tabla 8. Producción de sideróforos de los aislamientos seleccionados.

Aislamiento	E3	M8	M9	M14
Producción de sideróforos	+	+	+	+

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de producción de indoles totales detectados en los aislamientos seleccionados. Los valores más altos lo produjeron E3 (*Pseudomonas fluorescens*), 0,30 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ proteína en un medio suplementado con triptófano y M8 (*Pseudomonas aeruginosa*) 0,19 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ proteína. Sin embargo, Torres *et al.* (2000) consideran al género *Pseudomonas* como un bajo productor de fitohormonas, debido a que además, produce otras sustancias como los sideróforos. El valor más bajo encon-

trado para el mismo medio fue de 0,16 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ proteína para los aislamientos M9 (*Klebsiella* spp.) y M14 (*Serratia* spp.).

En el medio con ausencia de triptófano se encontraron valores muy bajos: 0,02 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ proteína para E3 y 0,01 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ proteína para M8, M9 y M14. Los resultados demuestran que la presencia de triptófano incide de manera significativa en la biosíntesis de indoles totales, lo que concuerda con lo establecido por diversos autores (Reynders y Vlassak, 1979; Hartman *et al.*, 1983; Baca *et al.*, 1994), quienes determinaron que la biosíntesis de AIA (ácido indol-3 acético) se incrementa cuando al medio se agrega triptófano.

Conclusiones

Se aislaron 14 cepas de microorganismos solubilizadores de fosfato, siete de Estación Aráoz y siete de El Manantial.

Cuatro presentaron eficiencia de solubilización superior a 100 y fueron caracterizados como *Pseudomonas fluorescens* (E3), *Pseudomonas aeruginosa* (M8), *Klebsiella* spp. (M9) y *Serratia* spp. (M14).

Los cuatro aislamientos seleccionados resultaron ser productores de indoles y de sideróforos, características que junto a la eficiencia de solubilización de fosfato, los hacen promisorios para ser usados como promotores del crecimiento vegetal.

Agradecimientos. Trabajo financiado por CIUNT 26/A431.

Referencias bibliográficas

Ahmad F.; Ahmad I., Khan M.S. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research. 36:1-9.

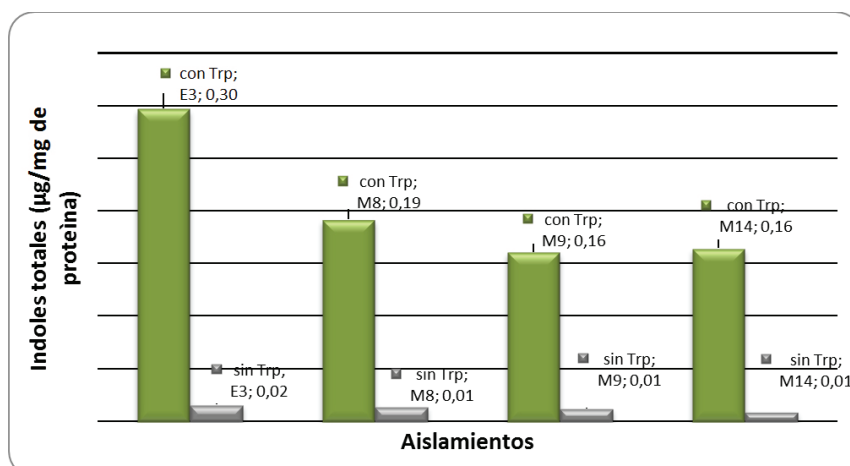


Fig. 6. Valores de indoles totales para los aislamientos seleccionados.

- Alexander M. (1987). Introduction of soil microbiology. Ed. Wiley and Sons. New York. 83-88.
- Asghar H.N., Zahir Z.A., Arshad M., Khaliq A. (2002). Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. Biology and Fertility of Soils. 35:231-237.
- Avendeño M.C., Cuesta García A., Cornejo Contreras I. (1984). Hidrólisis del almidón por bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 24 (4): 485-490.
- Baca B., Soto-Urzuá L., Xochihua-Corona Y., Cuervo-García A. (1994). Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indole acetic acid in *Azospirillum* spp. strains. Soil Biology y Biochememistry. 26: 57-63.
- Banik S., Dey B. (1982). Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. Plant and Soil 69 (3): 353-364.
- Barea J., Ferrol N., Azcón-Aguilar C., Azcón R. (2008). Mycorrhizal symbioses. In: The ecophysiology of plant-phosphorus interaction. White, P.; Hammond, J. (Eds). Springer Science Ltd. 143-166.
- Barotti G., Nahas E. (2000). População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 35(10): 2043-2050.
- Bartholomew J.W. (1962). Variables influencing results, and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. Stain Technology. 37: 139-155.
- Bashan Y., Holguin G., de-Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. Canadian Journal of Microbiology. 50: 521-577.
- Benbrook C. (1999). World food system challenges and opportunities: GMOs, biodiversity, and lessons from Ameritas Heartland. In: World food system challenges and opportunities. <http://www.pmac.net/IWFS.pdf>
- Bharathi R., Vivekananthan R., Harish S., Ramnathan A., Samiyappan R. (2004). Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. Crop Protection. 23: 835-843.
- Biswas J.C., Ladha L.K., Dazzo F.B. (2000). Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. Journal of Soil Science. 64:1644-1650.
- Black C. (1975). Relaciones suelo planta. 2ª ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 866 pp.
- Bonilla R., Novo R., Venegas N., Galvis A., Martinez M., Parra D., Vanegas O. (2000). Generación de tecnologías para la utilización de fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. 40pp.
- Burdman S., Jurkevitch B., Orkon Y. (1998). Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In Microbial interactions in agriculture and forestry. Subba Rao, N., Dommergues, Y. (Eds) Science Publishers, Inc, USA. II: 229-250.
- Carcaño-Montiel M., Ferrera-Cerrato R., Pérez-Moreno J., Molina-Galán J., Bashan Y. (2006). Actividad nitrogenasa en *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. Terra Latinoamericana. 496 (4): 493-502.
- Cattelan A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Science Society of America Journal 63:1670-1680.
- Chen Y., Rekha P., Arun A., Shen F., Lai W., Young C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34: 33-41.
- Cox C., Rinehart K., Moore M., Carter J. (1981). Pyochelin: Novel structure of an iron chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 78:4256-4260.
- Cross A., Schlessinger H. (1995). A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. Geoderma 64: 197-214.
- Cunningham J., Kuiack C. (1992). Production of acid citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. Applied and Environmental Microbiology 58 (5): 1451-1458.
- Davison J. (1988). Plant beneficial bacteria (review). Biotechnology 6: 282-286.
- de Freitas J.R., Banerjee M.R., Germida J.J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biology and Fertility of Soils 24: 358-364.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre F., Kapulnik Y., Brenner S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. (2001). Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Australian Journal of Plant Physiology 28: 871-879.
- Egamberdiyeva D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. Applied Soil Ecology 36: 184-189.
- El-Komy H.M.A. (2005). Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. Food Technology and Biotechnology 43: 19-27.
- Epple G. (2000). Fraccionamiento del fósforo en suelos sometidos a distintos manejos agrícolas. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 130 pp.
- Fang T., Yanqin D., Hui Z., Liangtong Y., Binghai D. (2009). Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. Brazilian Journal of Microbiology 40 (2): 276-284.
- Fernández L., Zalba P., Gomez M., Sagardoy M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Ciencia del Suelo 23 (1): 31-37.
- Germida J. J., Siciliano S. D. (2001). Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. Biology and Fertility of Soil 33(5): 410-415.
- Gómez-Guiñán Y., Zabala M. (2001). Determinación

- de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del mani (*Arachis hypogaea* L.). Saber. Universidad de Oriente, Venezuela. 13 (1): 8-13.
- González Bournonville E. (2008). Selección de bacterias solubilizadoras y mineralizadores de fósforo y azufre para incrementar el sistema radicular de la caña de azúcar. Segundas Jornadas de Jóvenes Investigadores. UNT-AUGM. 23-25 de Junio. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Gravel V., Antoun H., Tweddell R. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry 39: 1968-1977.
- Gyaneshwar P., Naresh K., Parekh L. (1998). Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 669-673.
- Haahtela K. (1985). Nitrogenase activity (acetilene reduction) in root-associated cold-climate species of *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* growing at various temperatures. FEMS Microbiology Ecology 31: 211-214.
- Hartmann A., Singh M., Klingmuller A. (1983). Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. Canadian Journal of Microbiology 29:916-923.
- Hebbar K.P., Martel M.H., Heulin T. (1998). Suppression of pre and post emergence damping off in corn by *Burkholderia cepacia*. European Journal of Plant Pathology 104: 29-36.
- Hernández A., Rives N., Caballero A., Hernández A., Heydrich M. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. Revista Colombiana de Biotecnología 6 (1): 6-13.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Lippincott Williams and Wilkins: 175-222.
- Illmer P., Schinner F. (1992). Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biology and Biochemistry 70: 222-234.
- INTA. (2004). Desarrollo de la aplicación de *Pseudomonas* solubilizadoras de fósforo en los principales cultivos del Norte de Buenos Aires. Protocolo de presentación de los ensayos de eficacia.
- Jeun Y.C., Park K.S., Kim C.H., Fowler W.D., Kloepper J.W. (2004). Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. Biological Control 29: 34-42.
- Johnson S., Loeppert R. (2006). Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. Soil Science Society of America Journal 70: 222-234.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied Microbiology 96: 473-480.
- Kim K., McDonald G., Jordan D. (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. Biology and Fertility of Soils 24 (4): 347-352.
- King E., Ward M., Raney D. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44: 301.
- Kloepper J., Lifshitz R., Zablutowicz R. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology 7: 39-49.
- Kobus J. (1962). The role of microorganisms in the transformation of phosphoric compounds in the soil. Acta Microbiológica Polónica 11: 255-262.
- Kozdroja J., Trevors J.T., Van Elsland J.D. (2004). Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 36: 1775-1784.
- Kucey R.M.N. (1983). Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Canadian Journal of Soil Science 63: 671-678.
- Kumar V., Rishi M., Kumar R.B., Narula N. (2001). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. Microbiology Research 156: 87-93.
- Lapeyrie F., Ranger J., Vairelles D. (1991). Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. Canadian Journal of Botany 69 (2): 342-346.
- Maxwell D., Bateman D. (1967). Oxalic acid biosynthesis by *Sclerotium rolfsii*. Phitopathology 58 (18): 1635-1642.
- Mazza J.P., Loréfice A., Ulla E.L. (2009). Comportamiento del arroz (*Oriza sativa* L.) inoculado con microorganismos solubilizadores de fosfatos en Tucumán. VII Reunión Nacional Científico Técnica de Biología del Suelo y Fijación Biológica del Nitrógeno. 1-3 de Julio. San Miguel de Tucumán, Argentina: 99.
- Mikinova O., Kubat J. (1994). Inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains with different P-solubilizing activity and its effects on soybean yields. Scientia Agrícola. Prague 25 (1): 63-67.
- Motok J., Díaz Ricci J.C., Pedraza R.O. (2006). Estudio de la actividad promotora del crecimiento vegetal producida por *Azospirillum* en plantas de frutilla. Trabajo final para la Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Nautiyal S.C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170: 265-270.
- Okon Y., Vanderleyden J. (1997). Root-Associated *Azospirillum* Species Can Stimulate Plants. American Society of Microbiology News 63: 366-370.
- Onthong J., Gimsanguan S., Pengnoo A., Nilnond C., Osaki M. (2007). Effect of pH and some cations on activity of acid phosphatase secreted from *Ustilago* sp. Isolated from acid sulphate soil. Songklanakarin. Journal of Science and Technology 29: 275-286.
- Ozturk A., Caglar O., Sahin F. (2003). Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 166: 262-266.
- Patten, C.L., Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology 34: 140-146.

- crobiology 42: 207-220.
- Peterson R., Massicotte H., Melville L. (2004). Arbuscular mycorrhizas. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC Research Press Journals. Ottawa. Canada. 3: 57-79.
- Raju N.S., Niranjana S.R., Janardhana G.R., Prakash H.S., Shetty H.S., Mathur S.B. (1999). Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biological agents. Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 206-212.
- Reynders, L. y Vlassak, K. (1979). Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*. Soil Biology and Biochemistry. 11:547-548.
- Rodríguez, H. y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17: 319-339.
- Roper, M. M. y Ladha, J. K. (1995). Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. Plant and Soil 174: 211-224.
- Rosa, F.; Machado, J.; Sandoval, C. y Barbosa, J. (1982). Densidade de microorganismos solubilizadores de fosfato dicálcico em solo de rizosfera de algumas leguminosas forrageiras. Científica Jaboticabal. 10 (2): 209-216.
- Salantur, A.; Ozturk, A. y Akten, S. (2006). Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. Plant, Soil and Environment. 52: 111-118.
- Sandoval, C.; Machado, J.; Rosa, F. y Barbosa, J. (1982). Densidade de microorganismos solubilizadores de fosfato dicálcico em solo de rizosfera de quatro espécies de gramíneas forrageiras. Científica Jaboticabal. 10 (1): 25-33.
- Schwyn, B.; Neilands, J. (1987). Universal Chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 160:47-56.
- Shah, S.; Karkhanis, V. y Desai, A. (1992). Isolation and characterization of siderophore antimicrobial activity from *Azospirillum lipoferum*. Current Microbiology. 25: 59-66.
- Shaharoon, B.; Arshad, M.; Zahir, Z. A. y Khalid, A. (2006). Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. Soil Biology and Biochemistry. 38: 2971-2975.
- Siddiqui, I. A. y Shaukat, S. S. (2002). Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. Biology and Fertility of Soils. 36: 260-268.
- Souchie, E. L.; Azcón, R.; Barea, J. M.; Saggin-Junior, O. y Ribeiro da Silva, E. M. (2005). Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 40 (11): 1149-1152.
- SPSS. (2005). Versión 13, SPSS Inc. Chicago, USA.
- Sylvia, D.; Fuhrmann, J.; Hartel, P. y Zuberer, D. (2005). Principles and applications of microbiology. Second Editions. Prentice Hall. New Jersey, USA: 464-466.
- Taha, S. M., Mahmoud, S. A. Z., E-Damaty, A. P. y Elhafez, A. M. A. (1969). Activity of phosphate dissolving bacteria in Egyptian soils. Plant and Soil. 31: 149-160.
- Tate, K. R. (1984). The biological transformation of P in soil. Plant and Soil. 76 (1-3): 245-256.
- Tisdale, S.; Warner, N.; Havlin, J y Beaton, J. (1993). Soil fertility and fertilizers. MacMillan. 5th ed. New York, USA: 634 pp.
- Torres, M; Valencia, A.; Bernal, J. y Martinez, P. (2000). Isolation of enterobacteria, *Azotobacter* sp and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from colombian rice rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42: 171-176.
- Ulla, E. L.; Delgado, J. A.; Pascual, E. M.; Ulla, E. E. y Sánchez, H. H. 2007. Microorganismos solubilizadores de fosfatos en algunos suelos del Noroeste Argentino. X Jornadas de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Formosa. 27-30 de Noviembre. Formosa, Argentina: 35.
- Ulla, E. L.; Ulla, E. E.; Sánchez, H. H.; Delgado, J. A.; Cortéz, J. D. 2006. Microorganismos solubilizadores de fosfatos en la rizósfera de orégano en la provincia de Catamarca. III Simposio Latinoamericano en Producción de Plantas Aromáticas Medicinales y Condimentarias. 20-23 de Setiembre. San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina. Ab3: 166.
- Vikram, A. (2007). Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. Research Journal of Microbiology. 2: 550-559.
- Whitelaw, M. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advances in Agronomy (Australia) 69: 99-152.
- Zuccardi, R; Fadda, G. (1985). Bosquejo agrológico de la provincia de Tucumán. Miscelánea. 86. Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT. Tucumán. 63 pp.