

Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.)

✉ Cecilia Lara, Sixto C Sanes, Luis E Oviedo

Grupo de Investigación en Biotecnología, GRUBIODEQ,
Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba
Cra. 6 No. 74-103, Apartado aéreo 354, Montería, Córdoba, Colombia
✉ lara_mantilla_cecilia@hotmail.com, lara.mantilla.cecilia@gmail.com,
clara@correo.unicordoba.edu.co

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad solubilizadora de fosfato de algunas bacterias nativas sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). Las bacterias se aislaron a partir de suelos del Departamento de Sucre (Colombia), usando medio selectivo de crecimiento con fosfato (NBRIP). Posteriormente se identificaron mediante observación macroscópica, microscópica y caracterización bioquímica, empleando el sistema de multipruebas API 20. La propiedad solubilizadora de fosfato se evaluó utilizando el método colorimétrico de ácido vanadomolibdato fosfato. Los microorganismos de más propiedades (*Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp.) se multiplicaron a concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 u.f.c./mL, y luego se introdujeron en las semillas de rábano. Se utilizaron ocho tratamientos, que incluyeron un control testigo y un control que recibió fertilizante mineral sintético comercial. Las variables biométricas: longitud de la raíz principal, área foliar y peso seco de las plantas que recibieron los tratamientos T5 (biopreparado con *Klebsiella* sp. a 10^7 u.f.c./mL) y T1 (biopreparado con *Enterobacter* sp. a 10^6 u.f.c./mL) fueron estadísticamente superiores al tratamiento control testigo. No hubo diferencias significativas en el peso seco con respecto a las plantas que recibieron T7 (fertilizante mineral sintético comercial). Se evidenció un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de rábano inoculadas con las bacterias, en comparación con los controles, lo que confirmó el efecto positivo de la actividad solubilizadora de fosfato de las cepas nativas.

Palabras clave: biofertilizantes, bioinoculantes, microorganismos solubilizadores de fosfato, parámetros biométricos

Biotechnologia Aplicada 2013;30:271-275

ABSTRACT

Impact of native phosphate solubilizing bacteria on the growth and development of radish (*Raphanus sativus*) plants. This work was aimed at evaluating the activity of native phosphate solubilizing bacteria on growth and development of radish (*Raphanus sativus* L.) plants. Bacteria were isolated from the Department of Sucre (Colombia) soil using selective media (NBRIP), further identified by macroscopic and microscopic observation and biochemically characterized using the API System. Their ability to solubilize phosphate was then evaluated using the vanadomolybdate acid phosphate colorimetric method. The microorganisms of the highest phosphate solubilizing capacity (*Enterobacter* sp. and *Klebsiella* sp.) were multiplied up to concentrations of 10^6 , 10^7 and 10^8 c.f.u./mL and then evaluated on radish seeds. Eight treatments were used including witness control and commercial control. Biometric variables, root length, leaf area and dry weight, for treatments T5 (biopreparation with *Klebsiella* sp., 10^7 c.f.u./mL) and T1 (biopreparation with *Enterobacter* sp., 10^6 u.f.c./mL) were statistically higher than the control treatment. In addition, no significant differences regarding dry weight were found with respect to T7 (chemical fertilizer). The growth and development of radish plants were improved in treatments inoculated with bacteria when compared to controls, confirming the positive effect of phosphate solubilizing activity of the native strains.

Keywords: biofertilizers, bioinoculants, phosphate solubilizing microorganisms, biometrics

Introducción

El fósforo es el segundo nutriente más importante en el desarrollo y crecimiento de plantas y microorganismos del suelo [1]. Su principal función fisiológica es la contribución en el aumento de la biomasa en los seres vivos, la obtención de micronutrientes, los procesos metabólicos de transferencia de energía, la transducción de señales, la biosíntesis de macromoléculas, la fotosíntesis y las reacciones de respiración en cadena [2, 3]. A pesar de ser muy abundante en la corteza terrestre, solo se encuentra en pequeñas proporciones para los vegetales, por lo que si se desea aumentar la producción de estos cultivos, se les debe suministrar fósforo incluido en los fertilizantes químicos. Sin embargo, más del 90 % del fósforo de

los abonos químicos tiende a acumularse en el suelo en forma de compuestos insolubles, y, de esa forma, las plantas no lo aprovechan [4].

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos en los suelos ocasiona la pérdida de la micro y la macrobiota, el agotamiento acelerado de la materia orgánica y un desbalance de nutrientes, que se refleja en la pérdida de la fertilidad y en la baja productividad de los suelos. Las tendencias mundiales van encaminadas hacia la agricultura sostenible, para la que se debe fomentar aún más el uso y tratamiento efectivo de los recursos naturales.

En tal sentido, los biofertilizantes o inoculantes microbianos constituyen un componente vital para los

1. Cheng-Hsiung C, Shang-Shyng Y. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresour Technol.* 2009;100(4):1648-58.

2. Conney M. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Madrid: Paraninfo; 2000.

3. Shenoy V, Kalagudi G. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnol Adv.* 2005;23(7-8): 501-13.

4. Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol.* 1995;41:109-17.

agroecosistemas, ya que son económicamente atractivos y aceptables para reducir el uso indiscriminado de sustancias químicas y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos [5, 6]. Su utilización en cultivos de interés ha proporcionado muchos beneficios económicos, sociales y ambientales para los agricultores y productores, por las propiedades de estos microorganismos para modificar las características del suelo y mantener el balance nutricional. Ellos producen metabolitos que facilitan la descomposición de la materia orgánica e incrementan el contenido de humus en el suelo. Todo ello incide favorablemente sobre el crecimiento de las plantas y la calidad de las cosechas, así como en el mejoramiento de la estabilidad química, física y biológica de los suelos [7-9].

A su vez, las bacterias tienen una función clave en el mantenimiento del delicado balance entre la materia acumulada y la materia degradada. Muchas de ellas son eficientes fijadoras de nitrógeno, otras son excelentes solubilizadoras de fósforo y algunas producen antioxidantes y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas. De modo que contribuyen sustancialmente en que los agricultores economizan en fertilizantes [10].

Las bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico tienen la propiedad de revertir los procesos de fijación de fósforo, por lo que se han relacionado con el incremento de este elemento en el suelo [11]. Su empleo puede contribuir a mejorar la fertilidad, y aumentar la productividad y rendimiento de los cultivos [12]. Los grupos bacterianos que pueden solubilizar fosfatos son varios: destacan los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Aerobacter*. Estos microorganismos también producen metabolitos, como fitohormonas y cianidas, y fijan el nitrógeno. Además, sintetizan otras sustancias que inducen la defensa frente a organismos patógenos o inhiben su crecimiento y desarrollo en los cultivos [13-15].

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad solubilizadora de fosfato de las bacterias nativas, en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.).

Materiales y métodos

Aislamiento de cepas solubilizadoras de fosfato

Las bacterias utilizadas se aislaron de muestras de suelo de los municipios de Corozal y San Juan de Betulia (Departamento de Sucre, Colombia). Se realizaron cuarteos y se tomaron 10 g de las cuadrículas seleccionadas al azar, que se disolvieron en 90 mL de NaCl estéril al 1 %. Luego de homogenizarlos por agitación durante 30 min, se hicieron diluciones seriadas hasta $1/10^4$, que se inocularon en placas Petri que contenían medio de cultivo NBRIP (glucosa 10 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 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 2.0 g/L y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L) [16]. Las placas se incubaron a 31 °C durante 48 h. Las colonias con halo se aislaron y resembraron en medio NBRIP.

Determinación de la actividad de solubilización de fosfato

Para la determinación de la actividad de solubilización de fosfato de cada bacteria se utilizó el método colorimétrico del ácido vanadomolibdato fosfato [17].

La técnica se estandarizó de acuerdo con las condiciones propias del equipo del laboratorio, empleando una curva patrón con concentraciones conocidas de fosfatos. Los microorganismos solubilizadores de fosfato se inocularon en medio de cultivo líquido NBRIP, y se incubó durante 48 h. Luego se centrifugaron y del sobrenadante se tomaron 7 mL para aplicar el método del ácido vanadomolibdato fosfato. Una vez obtenidas las absorbancias, se calcularon las concentraciones de fosfato, mediante interpolación en la ecuación de la curva patrón. Para cada bacteria el procedimiento se ensayó por triplicado.

Identificación y caracterización bacteriana

En la identificación macroscópica de las bacterias con mayor actividad solubilizadora de fosfato se tuvieron en cuenta la morfología de las colonias, el tamaño, el color, el borde, la elevación y la forma de la superficie [18]. En la identificación microscópica se consideraron el tipo de pared y de agregación, mediante tinciones específicas [19]. Para la identificación del género y la especie de las dos bacterias se utilizó el sistema de multipruebas API 20 (API System, S.A., La-Balme-les-Grottes, Francia) y las bases de datos de Apiweb™ [20].

Preparación de los bioinoculantes

Los bioinoculantes se prepararon a partir de las bacterias seleccionadas por desarrollar mayor actividad solubilizadora de fosfato, en un medio líquido NBRIP, en las concentraciones 10^6 , 10^7 y 10^8 u.f.c./mL, y bajo las condiciones de pH 6.8, con aireación adecuada por agitación y tiempo de incubación de 48 h. Los bioinoculantes se emplearon en el siguiente ensayo.

Actividad solubilizadora de fosfato en rábano

Se evaluó la actividad solubilizadora de fosfato de las bacterias con semillas de rábano (*R. sativus* L.). Estas se impregnaron con los bioinoculantes en las tres concentraciones, durante 60 min, y luego se sembraron en vasos desechables que contenían suelo con bajo contenido de fósforo (3.19-4.56 ppm).

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con ocho tratamientos (T) y 15 replicas cada uno:

- T0: control sin bioinoculante;
- T1, T2 y T3: bioinoculantes que contenían la bacteria Z_{32} , a 10^6 , 10^7 y 10^8 u.f.c./mL, respectivamente;
- T4, T5, T6: bioinoculantes que contenían la bacteria Z_{42} , a 10^6 , 10^7 y 10^8 u.f.c./mL, respectivamente;
- T7: fertilizante mineral sintético comercial, que contenía P_2O_5 .

La dosis se determinó a partir del análisis del suelo.

Se tomaron muestras a los 25 y 50 días de establecido el ensayo (posteriores a la siembra), y se evaluaron los siguientes parámetros biométricos [21, 22]: a) altura de las plantas (cm), a partir del nivel de la tierra hasta la hoja más alejada de cada planta; b) cantidad de hojas cotiledonales y verdaderas, fotosintéticamente activas en las plantas; c) área foliar, medida según la longitud desde la terminación del peciolo hasta el ápice de la hoja y su ancho, y mediante la fórmula de la elipse por ser la más cercana a la forma de las hojas; d) longitud de la raíz principal (cm) medida desde la base del tallo al ápice radical; y e) peso seco constante,

5. Mejía G. Agricultura para la vida: movimientos alternativos frente a la agricultura química. Cali: Feriva; 1995.
6. Echeverri R, Castilla A. Biofertilizantes como mejoradores del proceso de nutrición del arroz. *Rev Arroz*. 2008;56(474): 12-27.
7. Berc J, Muñoz O, Calero B. Vermiculture offers a new agricultural paradigm. *Biocycle*. 2004;45(6):56-7.
8. Tognetti C, Laos F, Mazzarino MJ, Hernández MT. Composting vs. vermicomposting: A comparison of end product quality. *Compost Sci Util*. 2005;13(1):6-13.
9. Christy M, Ramalingam R. Vermicomposting of sago - industrial solid waste using an epigeic earthworm *Eudrilus eugeniae* and macronutrients analysis of vermicompost. *Asian J Microb Biotechnol Environ Sci*. 2005;7(3):377-81.
10. Trutmann P. Guía Salud de suelos. Manual para el cuidado de la salud de suelos. Para Agricultores, Promotores y extensionista. Honduras: PROMIPAC; 2001.
11. Rodríguez H, Rubiano ME. Aislamiento e identificación de hongos solubilizadores de fosfatos aislados de cultivos de arroz y evaluación del pH y concentraciones de sacarosa y cloruro de sodio sobre su actividad solubilizadora [Tesis de Grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2002.
12. Cordero J, Ortega-Rodés P, Ortega E. La inoculación de plantas de *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Rev Colomb Biotechnol*. 2008;10(1):111-21.
13. Kloepper JW, Lifshitz R, Zablottowicz RM. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*. 1989;7(2):39-44.
14. Kim KY, Jordan D, McDonald GA. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol Fert Soils*. 1998;26(2):79-87.
15. Oviedo ME, Iglesias MC. Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás [Abstract]. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A-053. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste, Argentina; 2005 [cited 2013 Aug 14]. Available from: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/5-Agrarias/A-053.pdf>
16. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;170(1):265-70.
17. Kitson RE, Mellon MG. Colorimetric determination of phosphorus as molybdo-vanado phosphoric acid. *Ind Eng Chem Anal Ed*. 1944;16(6):379-83.
18. Molano A. Aislamiento de bacterias biofertilizantes (*Nitrobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) para un sistema de compost tipo windrow. *Umbral Científico*. 2004;5(5):25-32.
19. Breed RS, Murray EGD, Smith NR, et al. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 7th ed. Baltimore: William & Wilkins Co.; 1957.

para lo cual se seccionó cada planta en raíz, tallo y hojas, que se secaron en estufa a 60 °C hasta alcanzar el peso seco constante.

Al suelo de la zona de muestreo se le determinó el contenido de fósforo [23, 24] y el experimento se realizó con el suelo de más bajo contenido.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con la ayuda del programa estadístico Statistix® versión 9.0 (Analytical Software, 2007). Los datos se sometieron a un análisis de varianza, en un DCA, que se evaluó mediante la prueba de Tukey con una probabilidad de 5 % para determinar el mejor tratamiento.

Resultados y discusión

Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfato

Los resultados o valores promedios de los diámetros de los halos y la concentración de fosfato solubilizado por los aislados bacterianos nativos incubados durante nueve días a 31 °C, se muestran en la tabla 1. Las cepas Z₃₂ y Z₄₂ promovieron las mayores concentraciones de fosfato solubilizado, a 596 ppm y 562 ppm, respectivamente.

Los tamaños de los halos en este trabajo fueron similares a los de otras investigaciones. En el medio NBRIP se han observado variaciones del diámetro de

los halos de 4 a 15 mm [25], por diferentes especies bacterianas incubadas durante 11 días a 28 °C. Otros estudios refieren valores de 2 mm (*Bacillus polymyxa*), 6 mm (*Pseudomonas aeruginosa*) y 7 mm (*P. fluorescens*), luego de 14 días de incubación a 28 °C [16].

Se identificaron las bacterias con más propiedades de solubilización de fosfato. El aislado bacteriano Z₃₂ correspondió al género *Enterobacter* sp. (*Enterobacter cloacae*, con una confiabilidad del 95.1 %, según el programa informático de la base de datos empleada para tal fin) y el aislado Z₄₂ perteneció al género *Klebsiella* sp. (*Klebsiella oxytoca*, con una confiabilidad del 97.7 %). Estos microorganismos son bacilos gramnegativos. Sus colonias son circulares, de color crema, miden entre 1 y 3 mm, y tienen un borde entero, elevado y una superficie suave y brillante.

Los mayores valores del diámetro del halo no se correspondieron con los valores más elevados de la concentración de fosfato solubilizado (Tabla 1). Por ejemplo, las bacterias *E. cloacae* (aislado Z₃₂) y *K. oxytoca* (aislado Z₄₂) con diámetros de halos menores, poseían los valores más elevados de concentración de solubilización de fosfato. Algunos investigadores han encontrado resultados contradictorios entre el método de detección del halo en placas y la solubilización de fosfato en cultivos líquidos, ya que muchos microorganismos no originan halos en medios sólidos, pero pueden solubilizar varios tipos de fosfatos en medios líquidos. La formación de halos en medios de cultivo sólidos, permite predecir macroscópicamente las posibilidades de estos microorganismos de solubilizar diferentes tipos de fósforo [16, 26].

Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfato en plantas de rábano

En esta investigación se empleó el rábano (*R. sativus* L.) como planta modelo, porque su crecimiento es rápido y por ser genéticamente homogénea. Sus frutos pueden cosecharse a partir de los 30 días de cultivada, y es una planta que absorbe grandes cantidades de fósforo del suelo [27].

En la tabla 2 se agrupan los resultados promedios de los parámetros biométricos, correspondientes a la altura de las plantas, la cantidad de hojas, el área foliar, la longitud de la raíz principal y el peso seco.

Tabla 1. Diámetro del halo y concentración de fosfato obtenido a partir de los aislados bacterianos nativos solubilizadores de fosfato

Aislados bacterianos	Diámetro del halo (mm)	Concentración de fosfato solubilizado (ppm)
Z ₁₁	2	58
Z ₁₂	16	232
Z ₁₃	0	46
Z ₁₄	9	98
Z ₂₁	8	108
Z ₃₁	3	514
Z ₃₂	5	596*
Z ₄₁	3	418
Z ₄₂	3	562†

* Z₃₂: bacteria *Enterobacter cloacae*.

† Z₄₂: bacteria *Klebsiella oxytoca*.

Tabla 2. Efecto de los bioinoculantes Z₃₂ y Z₄₂ en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.)

Tratamientos*	Altura de las plantas (cm)		Cantidad de hojas		Área foliar (cm ²)		Longitud de la raíz principal (cm)		Peso seco (g)	
	25 días	50 días	25 días	50 días	25 días	50 días	50 días	50 días	50 días	50 días
T0	7.82 ^{AB}	11.45 ^B	3.53 ^B	5.66 ^A	26.04 ^B	55.30 ^B	6.97 ^B		0.76 ^{AB}	
T1	7.65 ^{AB}	11.89 ^B	4.40 ^{AB}	6.13 ^A	31.78 ^{AB}	76.35 ^B	7.64 ^{AB}		1.01 ^A	
T2	8.31 ^{AB}	11.51 ^B	4.66 ^{AB}	5.20 ^A	37.20 ^{AB}	76.89 ^B	8.16 ^{AB}		0.66 ^B	
T3	7.59 ^{AB}	12.06 ^B	4.73 ^{AB}	5.80 ^A	37.75 ^{AB}	74.40 ^B	9.35 ^{AB}		0.78 ^{AB}	
T4	7.20 ^{AB}	10.82 ^B	4.60 ^{AB}	5.73 ^A	34.29 ^{AB}	68.13 ^B	9.01 ^{AB}		0.66 ^B	
T5	6.92 ^B	12.60 ^B	4.53 ^{AB}	6.00 ^A	32.49 ^{AB}	76.56 ^B	9.03 ^{AB}		0.94 ^A	
T6	7.39 ^{AB}	11.12 ^B	4.46 ^{AB}	5.53 ^A	31.99 ^{AB}	66.46 ^B	10.48 ^A		0.78 ^{AB}	
T7	9.16 ^A	17.32 ^A	4.86 ^A	6.00 ^A	52.06 ^A	126.15 ^A	9.53 ^{AB}		1.03 ^A	

* Tratamientos: T0: control sin bioinoculante; T1, T2 y T3: bioinoculantes que contenían la bacteria Z₃₂ (*Enterobacter cloacae*), a 10⁶, 10⁷ y 10⁸ u.f.c./mL, respectivamente; T4, T5, T6: bioinoculantes que contenían la bacteria Z₄₂ (*Klebsiella oxytoca*), a 10⁶, 10⁷ y 10⁸ u.f.c./mL, respectivamente; T7: fertilizante mineral sintético comercial que contenía P₂O₅. La dosis de cada uno se determinó a partir del análisis del suelo.

^{A,B} Letras iguales no presentan diferencias significativas, con una probabilidad de 5 %, según la prueba de Tukey, a partir de un diseño completamente al azar. Los datos representan el promedio de 15 réplicas. Las comparaciones estadísticas fueron independientes para cada tiempo en las diferentes variables.

20. Hernández A. Obtención de un bio-preparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) [Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana; 2002.

21. Apiweb™ [Internet]. bioMérieux Clinical Diagnostics. Marcy l'Etoile: bioMérieux S.A.; c1996-2013 [cited 2013 Aug 8]. Available from: http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_12

22. Ramírez PR, Pérez MI. Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanus sativus* L.). Rev Fac Nal Agr Medellín. 2006;59(2):3543-56.

23. Coraspe HM, Tejera S. Procedimiento para toma de muestra de suelo. Revista Fonaip Divulga. 1996;(54):23-5.

24. López M, Martínez R, Brossard FM, Bolívar A, Alfonso N, Alba A, et al. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. Agronomía Trop. 2008;58(4):391-401.

25. Fernández LA, Zalba P, Gomez MA, Sagardoy MA. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Cienc Suelo. 2005; 23(1):31-7.

26. Gupta R, Singal R, Shankar A, Kuhad RC, Saxena RK. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. J Gen Appl Microbiol. 1994; 40:255-60.

27. Hewitson JF, Price R. Plant mineral nutrition in classroom: the radish, *Raphanus sativus* L. is a good plant for such studies. School Sci Rev. 1994;76(274):45-55.

Altura de las plantas

A los 25 días del ensayo fue más evidente el crecimiento de las plantas con los tratamientos T2 (bioinoculante con el aislado Z₃₂ de *E. cloacae*, 10⁶ u.f.c./mL) y T7 (fertilizante mineral sintético comercial). Tenían las mayores alturas, sin diferencias significativas entre ellos. En la segunda evaluación (50 días después de la siembra), el tratamiento T7 favoreció un mayor crecimiento que fue estadísticamente diferente respecto a los demás.

Cantidad de hojas

En cuanto a la cantidad de hojas, a los 25 días no hubo diferencias significativas entre el tratamiento con fertilizante químico y los tratamientos con bioinoculantes; aunque sí las hubo entre el tratamiento T7 (fertilizante químico comercial) y el control. En la segunda evaluación (50 días), todos los tratamientos fueron estadísticamente similares.

Área foliar

A los 25 días, aunque el área foliar de las plantas que recibieron tratamiento con fertilizante (T7) fue superior, no hubo diferencias significativas entre estas y las que recibieron los tratamientos con bioinoculantes. Sin embargo, a los 50 días, el T7 superó significativamente a los demás tratamientos. El área foliar de las plantas que recibieron los tratamientos con bioinoculantes fue superior al control. Los resultados positivos en las plantas de rábano demuestran que la inoculación con microorganismos nativos estimuló el desarrollo y crecimiento de las partes aéreas de las plantas.

Esto se ha señalado en otras investigaciones que han destacado a las rizobacterias como promotoras del crecimiento en plantas de maíz, con un mayor desarrollo de su parte aérea [28, 29]. También se ha demostrado que estos microorganismos secretan sustancias que regulan el crecimiento vegetal, pues producen enzimas como fosfatasa ácida y fitasas, que incrementan el fósforo soluble en el suelo, estimulan la longitud radical y contribuyen a la proliferación de brotes en diferentes especies de plantas [30, 31].

Longitud de la raíz principal

A los 50 días, el T6 (bioinoculante con el aislado Z₄₂ de *K. oxytoca*, 10⁸ u.f.c./mL) estimuló la mayor longitud de la raíz principal con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, incluyendo el fertilizante químico y el control. La longitud de la raíz principal de las plantas inoculadas fue mayor que el tratamiento control (Tabla 1). Los tratamientos aumentan la eficiencia en la asimilación de nutrientes que inciden en el desarrollo vegetal. Tales resultados probablemente se deban a la producción de fitohormonas de los inoculantes nativos, como auxinas y giberelinas, que estimulan el crecimiento, desarrollo y alargamiento del sistema radicular. Otros autores [32] describen que las bacterias del género *Klebsiella* sp., además de fijar el nitrógeno, se adhieren y colonizan las raíces, les provocan una teración en la morfología y aumentan la cantidad de pelos radicales, por la producción de sustancias bioactivas (como las auxinas) en el 80 % de las cepas aisladas. Según otras investigaciones, la fitohormona más importante producida por *Klebsiella* sp. es la auxina ácido indol acético (AIA), que provoca

cambios morfológicos en la raíz principal. Este compuesto también se ha relacionado con la absorción de minerales, pues se percibe una mayor producción de biomasa por los vegetales [33-35].

Peso seco

Los tratamientos T1 (bioinoculante con aislado Z₃₂ de *E. cloacae*, 10⁶ u.f.c./mL), T5 (bioinoculante con la bacteria Z₄₂ de *K. oxytoca*, 10⁷ u.f.c./mL) y T7 (fertilizante químico comercial) influyeron en los mejores resultados de materia seca del rábano, estadísticamente diferentes al resto. Los tratamientos con los inoculantes T1 y T5 fueron similares al tratamiento con fertilización mineral (T7); destaca el beneficio de las bacterias nativas solubilizadoras de fosfato.

La asimilación de fosfatos por los vegetales contribuye al aumento de su metabolismo, y ello se manifiesta en un mayor contenido de materia orgánica. La asimilación de una mayor cantidad de fósforo influye positivamente en la rápida formación y crecimiento de las raíces en estado de plántula, acelera la maduración, estimula la coloración de los frutos, ayuda a la formación de semillas, es un componente de los ácidos nucleicos, de los fosfolípidos (esenciales para la membrana celular) y de las moléculas de transferencia de energía como el trifosfato de adenosina [36-38].

Es importante destacar que las plantas inoculadas con las bacterias nativas lucían sanas y más vigorosas que las tratadas con los controles. Curiosamente, las bacterias de los géneros *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp. no son agentes de control biológico típicos. No obstante, se pueden considerar microorganismos rizocompetentes, capaces de multiplicarse para formar grandes poblaciones en determinadas condiciones o por preferencia de algunos sustratos, por lo que podrían desplazar a otros microorganismos, incluso patógenos y, en este proceso, reducir la aparición de enfermedades, e incidir en el crecimiento y desarrollo sano de las plantas [39].

En un estudio anterior se identificó un aislado de *Enterobacter cloacae* a partir de muestras de suelo del Departamento de Córdoba, vecino al de Sucre, aislado que mostró alta actividad solubilizadora de fosfato in vitro [40]. Esto pudiera apuntar en estudios posteriores al empleo de aquellas bacterias que muestren alta actividad solubilizadora de fosfato y tengan una amplia distribución geográfica, de forma que se puedan escalar en su empleo como bioinoculantes sin alterar la microbiota nativa.

En resumen, los resultados de esta investigación demostraron que la inoculación de las bacterias nativas solubilizadoras de fosfato *E. cloacae* (aislado Z₃₂) y *K. oxytoca* (aislado Z₄₂), aisladas de los suelos del Departamento de Sucre (Colombia), poseen propiedades provechosas para la agricultura sostenible, al incidir favorablemente en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*R. sativus* L.). Los biopreparados a partir de las cepas estudiadas pueden llegar a tener mucha utilidad si se inoculan en los cultivos de la región. Podrán aumentar la población microbiana de la rizosfera y contribuir al sistema nutricional de las plantas. A su vez, los bioinoculantes pueden ser una alternativa al uso de fertilizantes fosfóricos, y convertirse en un componente vital en los sistemas agrícolas sustentables. Constituyen un medio económico y

28. Mayak S, Tirosh T, Glick B. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem.* 2004;42(6):565-72.

29. Santillana N. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecol Apl.* 2006;5(1-2):87-91.

30. Martínez SM, Martínez GA. Effects of phosphate-solubilizing bacteria during the rooting period of sugar cane (*Saccharum officinarum*), Venezuela 51-71 variety, on the grower's oasis substrate. In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C, editors. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Salamanca, Spain, 16-19 July 2002. Dordrecht: Springer; 2007. p. 317-23.

31. Valero NO. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociados a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) [Tesis de Maestría Interfacultades en Microbiología]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2003.

32. Hahtela K, Rönkkö R, Laakso T, Williams PH, Korhonen TK. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: characterization of an iron-scavenging system and a substance stimulating root hair production. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1990;3:358-65.

33. El-Khawass H, Adachi K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol Fert Soils.* 1999;28(4):377-81.

34. Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(4):487-506.

35. Kämpfer P, Ruppel S, Remus R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol.* 2005; 28(3):213-21.

36. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, editors. *Brock: Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid: Pearson-Prentice Hall; 2003.

37. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiología*. 5 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2004.

38. *Microbiología General* [Internet]. Granada: Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada; c2005. [cited 2013 Aug 14]. Available from: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm>

39. Bashan Y, De-Bashan LE. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(6):2637-43.

40. Lara C, Esquivel Avila LM, Negrete Peña, JL. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Rev Bio Agro.* 2011;9(2):114-20.

ecológicamente atractivo, que reduciría los insumos externos, mejoraría la calidad y producción de los cultivos y contribuiría a conservar el ambiente.

La utilización de microorganismos beneficiosos como *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp. puede con-

vertirse en corto tiempo en un sustituto o complemento de los fertilizantes químicos en los cultivos de interés, por sus propiedades para solubilizar fosfato y enriquecer los suelos deficientes de este macronutriente.

Recibido en marzo de 2013.

Aprobado en junio de 2013.

Impact of native phosphate solubilizing bacteria on the growth and development of radish (*Raphanus sativus* L.) plants

✉ Cecilia Lara, Sixto C Sanes, Luis E Oviedo

Grupo de Investigación en Biotecnología, GRUBIODEQ,
Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba
Cra. 6 No. 74-103, Apartado aéreo 354, Montería, Córdoba, Colombia
✉ lara_mantilla_cecilia@hotmail.com, lara.mantilla.cecilia@gmail.com,
clara@correo.unicordoba.edu.co

ABSTRACT

This work was aimed at evaluating the activity of native phosphate solubilizing bacteria on growth and development of radish (*Raphanus sativus* L.) plants. Bacteria were isolated from the Department of Sucre (Colombia) soil using selective media (NBRIP), further identified by macroscopic and microscopic observation and biochemically characterized using the API System. Their ability to solubilize phosphate was then evaluated using the vanadomolybdate acid phosphate colorimetric method. The microorganisms of the highest phosphate solubilizing capacity (*Enterobacter* sp. and *Klebsiella* sp.) were multiplied up to concentrations of 10^6 , 10^7 and 10^8 c.f.u./mL and then evaluated on radish seeds. Eight treatments were used including witness control and commercial control. Biometric variables, root length, leaf area and dry weight, for treatments T5 (biopreparation with *Klebsiella* sp., 10^7 c.f.u./mL) and T1 (biopreparation with *Enterobacter* sp., 10^6 u.f.c./mL) were statistically higher than the control treatment. In addition, no significant differences regarding dry weight were found with respect to T7 (chemical fertilizer). The growth and development of radish plants were improved in treatments inoculated with bacteria when compared to controls, confirming the positive effect of phosphate solubilizing activity of the native strains.

Keywords: biofertilizers, bioinoculants, phosphate solubilizing microorganisms, biometrics

Biotecnología Aplicada 2013;30:276-279

RESUMEN

Impact of native phosphate solubilizing bacteria on the growth and development of radish (*Raphanus sativus* L.) plants. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad solubilizadora de fosfato de algunas bacterias nativas sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). Las bacterias se aislaron a partir de suelos del Departamento de Sucre (Colombia), usando medio selectivo de crecimiento con fosfato (NBRIP). Posteriormente se identificaron mediante observación macroscópica, microscópica y caracterización bioquímica, empleando el sistema de multipruebas API 20. La propiedad solubilizadora de fosfato se evaluó utilizando el método colorimétrico de ácido vanadomolibdato fosfato. Los microorganismos de más propiedades (*Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp.) se multiplicaron a concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 u.f.c./mL, y luego se introdujeron en las semillas de rábano. Se utilizaron ocho tratamientos, que incluyeron un control testigo y un control que recibió fertilizante mineral sintético comercial. Las variables biométricas: longitud de la raíz principal, área foliar y peso seco de las plantas que recibieron los tratamientos T5 (biopreparado con *Klebsiella* sp. a 10^7 u.f.c./mL) y T1 (biopreparado con *Enterobacter* sp. a 10^6 u.f.c./mL) fueron estadísticamente superiores al tratamiento control testigo. No hubo diferencias significativas en el peso seco con respecto a las plantas que recibieron T7 (fertilizante mineral sintético comercial). Se evidenció un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de rábano inoculadas con las bacterias, en comparación con los controles, lo que confirmó el efecto positivo de la actividad solubilizadora de fosfato de las cepas nativas.

Palabras clave: biofertilizantes, bioinoculantes, microorganismos solubilizadores de fosfato, parámetros biométricos

Introduction

Phosphorus is the second most important nutrient for growth and development of both, plants and soil microorganisms [1]. The main physiological functions of this compound in nature deals with micronutrients intake, the increase in biomass of living organisms, metabolic processes of energy transfer, signal transduction, macromolecular biosynthesis, and photosynthesis and respiration chain reactions [2, 3]. Despite being very abundant in the earth as such, it is only found in small proportions in plants so to increase crop production, phosphorus must be provided as a component of chemical fertilizers. However, over 90 % of phosphorus supplemented in chemical fertilizers

tends to accumulate in the soil as insoluble compounds that plants cannot use efficiently [4].

The indiscriminate use of chemical fertilizers causes the loss of soil micro and macrobiota together with the accelerated depletion of organic matter and nutrient imbalance, reflected in the loss of fertility and low productivity of soils. Global trends point towards sustainable agriculture, for which should be further encouraged the use and effective treatment of natural resources.

In this regard, bio-fertilizers or microbial inoculants become a vital component of agroecosystems, because they are economically attractive and acceptable

1. Cheng-Hsiung C, Shang-Shyng Y. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresour Technol.* 2009;100(4):1648-58.

2. Conney M. *Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio*. Madrid: Paraninfo; 2000.

3. Shenoy V, Kalagudi G. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnol Adv.* 2005;23(7-8): 501-13.

4. Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol.* 1995;41:109-17.

to reduce the indiscriminate use of chemicals, improving the quantity and quality of domestic remedies [5, 6]. Its use in crops of interest has provided many economic, social and environmental benefits for farmers and producers, due to biofertilizers ability to modify the properties of the soil while keeping its correct nutritional balance. They produce metabolites which facilitate the decomposition of organic material and increase the content of humus. This fact has a positive impact on plant growth and crops quality, as well as improving soil chemical, physical and biological stability [7-9].

Additionally, these bacteria have a key role in maintaining the delicate balance between accumulated and degraded matter. Many of them are efficient in nitrogen fixation or excellent phosphorus solubilization; others produce antioxidants and hormones that stimulate plants growth contributing substantially with farmers to economize chemical fertilizers [10].

The inorganic phosphate solubilizing bacteria have the property of reversing the processes of phosphorus fixation so that, they are related to increase the availability of this element on the soil [11] improving fertility, productivity and crop yields [12]. Several bacterial groups can solubilize phosphates. Among them, the most important genera are *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Micrococcus* and *Aerobacter*. These organisms also produce metabolites such as phytohormones or cyanides. Additionally, they can fix nitrogen and synthesize other substances that induce defense against pathogenic organisms or inhibit their growth and development in economically relevant crops [13-15].

The aim of this study was to determine the phosphate solubilizing activity of native bacteria in the growth and development of radish plants (*Raphanus sativus* L.).

Materials and methods

Isolation of phosphate solubilizing strains

The bacteria used were isolated from soil samples from the municipalities of Corozal and San Juan de Betulia (Department of Sucre, Colombia). Samples of 10 g of randomly selected soil squares were dissolved in 90 mL of sterile 1 % NaCl. After 30 min homogenization by stirring, serial dilutions up to $1/10^4$ were done and further plated in Petri dishes containing NBRIP medium (10 g/L glucose, 5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L KCl and 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) [16] and incubated at 31 °C for 48 h. Colonies forming halos were isolated and replated in NBRIP medium.

Determination of phosphate solubilization activity

The acid colorimetric method of vanadomolybdate phosphate was used to determine the phosphate solubilization activity of each bacterium [17]. The technique was standardized according to the available laboratory equipment conditions, using a standard curve with known concentrations of phosphates. Phosphate solubilizing microorganisms were inoculated on NBRIP liquid medium, and incubated for 48 h, then centrifuged and 7 mL of the supernatant were used for the vanadomolybdate acid phosphate method. Once

the absorbance value for each sample was obtained, the phosphate concentrations were calculated by interpolation with the standard curve equation. The procedure for each bacterium was tested in triplicate.

Bacterial Identification and characterization

Colony morphology, size, color, border, elevation and shape of the surface were the used parameters for macroscopic identification of those bacteria with more phosphate solubilizing activity [18]. In microscopic identification, the type of wall and aggregation were considered using specific dyes [19]. The multitests API 20 system (API System SA, La-Balme-les-Grottes, France) and databases apiweb™ [20] were used to identify the genus and species of the two bacteria.

Preparation of bioinoculants

Bioinoculants were prepared from the selected bacteria able to develop higher phosphate solubilizing activity at concentrations 10^6 , 10^7 and 10^8 c.f.u./mL, in NBRIP liquid medium, pH 6.8, with adequate aeration by stirring and agitation for 48 h. The harvested bio-inoculants were used in the following assay.

Phosphate solubilizing activity in radish

Bacterial phosphate solubilizing activity was evaluated in radish seeds (*R. sativus* L.). They were impregnated with bioinoculants in the three concentrations described for 60 min, and then planted in disposable pots containing ground with low phosphorus content (3.19-4.56 ppm).

A completely randomized design (CRD) was used, with eight treatments (T) and 15 replicates each as follows:

T0: control without bioinoculant;

T1, T2 and T3: bioinoculant based on Z_{32} bacterial isolate at 10^6 , 10^7 and 10^8 c.f.u./mL, respectively;

T4, T5 and T6: bioinoculant based on Z_{42} bacterial isolate at 10^6 , 10^7 and 10^8 c.f.u./mL, respectively;

T7: commercial synthetic mineral fertilizer, containing P_2O_5 .

The correct dose to be applied was determined from soil analysis.

Samples were taken at 25 and 50 days after planting (starting test date), and the following biometric parameters were evaluated [21, 22]: a) plant height (cm), from the level of the ground to the furthest leaf of each plant; b) amount of cotyledonal leaves and true photosynthetically active; c) leaf area, measured by the length from the end of the petiole to the tip of the leaf and its width, using the ellipse formula to be the closest to the leaves shape; d) primary root length (cm) measured from the base of the stem to the root apex and e) constant dry weight, which was sectioned for each plant roots, stems and leaves, which were dried in a 60 °C oven until a constant dry weight was reached.

The phosphorus content in the analyzed soil was determined [23, 24] and the experiment was conducted with soils displaying the lowest phosphorus content.

Statistical analysis

Data were analyzed with the help Statistix® statistical software version 9.0 (Analytical Software, 2007).

5. Mejía G. Agricultura para la vida: movimientos alternativos frente a la agricultura química. Cali: Feriva; 1995.

6. Echeverri R, Castilla A. Biofertilizantes como mejoradores del proceso de nutrición del arroz. Rev Arroz. 2008;56(474): 12-27.

7. Berc J, Muñoz O, Calero B. Vermiculture offers a new agricultural paradigm. Biocycle. 2004;45(6):56-7.

8. Tognetti C, Laos F, Mazzarino MJ, Hernández MT. Composting vs. vermicomposting: A comparison of end product quality. Compost Sci Util. 2005;13(1):6-13.

9. Christy M, Ramalingam R. Vermicomposting of sago - industrial solid waste using an epigeic earthworm *Eudrilus eugeniae* and macronutrients analysis of vermicompost. Asian J Microb Biotechnol Environ Sci. 2005;7(3):377-81.

10. Trutmann P. Guía Salud de suelos. Manual para el cuidado de la salud de suelos. Para Agricultores, Promotores y extensionista. Honduras: PROMIPAC; 2001.

11. Rodríguez H, Rubiano ME. Aislamiento e identificación de hongos solubilizadores de fosfatos aislados de cultivos de arroz y evaluación del pH y concentraciones de sacarosa y cloruro de sodio sobre su actividad solubilizadora [Tesis de Grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2002.

12. Cordero J, Ortega-Rodés P, Ortega E. La inoculación de plantas de *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. Rev Colomb Biotechnol. 2008;10(1):111-21.

13. Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. 1989;7(2):39-44.

14. Kim KY, Jordan D, McDonald GA. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biol Fert Soils. 1998;26(2):79-87.

15. Oviedo ME, Iglesias MC. Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás [Abstract]. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A-053. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste, Argentina; 2005 [cited 2013 Aug 14]. Available from: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/5-Agrarias/A-053.pdf>

16. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS Microbiol Lett. 1999;170(1):265-70.

17. Kitson RE, Mellon MG. Colorimetric determination of phosphorus as molybdovanado phosphoric acid. Ind Eng Chem Anal Ed. 1944;16(6):379-83.

18. Molano A. Aislamiento de bacterias biofertilizantes (*Nitrobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) para un sistema de compost tipo windrow. Umbral Científico. 2004;5(5):25-32.

19. Breed RS, Murray EGD, Smith NR, et al. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 7th ed. Baltimore: William & Wilkins Co.; 1957.

Data from the CRD were subjected to analysis of variance, which was further assessed by the Tukey's test with a probability of 5 % to determine the best treatment.

Results and discussion

Identification of phosphate solubilizing bacteria

The results or average values of the formed halos diameters and the solubilized phosphate concentration, as consequence of native bacterial isolates action after incubation for nine days at 31 °C, are shown in table 1. *Z₃₂* and *Z₄₂* isolates promoted the highest concentrations of solubilized phosphate, reaching values of 596 ppm and 562 ppm, respectively.

The halos sizes in this study were similar to those obtained in other investigations. On NBRIP supplemented medium, diameter halos variations of 4 to 15 mm in size were observed [25], for different bacterial species incubated 11 days at 28 °C. Other studies reported values of 2 mm (*Bacillus polymyxa*), 6 mm (*Pseudomonas aeruginosa*) and 7 mm (*P. fluorescens*) after incubation for 14 days at 28 °C [16].

Bacterial species displaying the best phosphate solubilizing activity were identified. Bacterial isolate *Z₃₂* corresponded to the genus *Enterobacter* sp. (*Enterobacter cloacae*, with a reliability of 95.1 %, according to the computer program of the database used for this purpose) and the isolated *Z₄₂* belonged to the genus *Klebsiella* sp. (*Klebsiella oxytoca*, with a reliability of 97.7 %). These microorganisms are gram-negative

Table 1. Halo diameter and phosphate concentration obtained from isolated native phosphate solubilizing bacteria

Bacterial isolates	Halo diameter (mm)	Solubilized phosphate concentration (ppm)
<i>Z₁₁</i>	2	58
<i>Z₁₂</i>	16	232
<i>Z₁₃</i>	0	46
<i>Z₁₄</i>	9	98
<i>Z₂₁</i>	8	108
<i>Z₃₁</i>	3	514
<i>Z₃₂</i>	5	596*
<i>Z₄₁</i>	3	418
<i>Z₄₂</i>	3	562†

* *Z₃₂*: *Enterobacter cloacae*.

† *Z₄₂*: *Klebsiella oxytoca*.

bacilli. Their colonies are circular, cream-colored, 1-3 mm in diameter, with an entire and elevated edge, and showing a smooth and shiny surface.

The highest values related to zone diameter did not correspond to the highest solubilized phosphate concentrations (Table 1). For example, the bacteria *E. cloacae* (isolate *Z₃₂*) and *K. oxytoca* (isolate *Z₄₂*) with smaller diameters halos, displayed the highest phosphate solubilization concentration. Some researchers have found contradictory results between the halo detection method in plates and the phosphate solubilization values in liquid cultures, since many microorganisms do not originate halos on solid media, but can solubilize various types of phosphates in liquid media. Halos formation on solid culture media macroscopically predicts that these microorganisms could solubilize various types of phosphates in liquid media [16, 26].

Evaluation of phosphate solubilizing activity in radish plants

In this research we used the radish (*R. sativus* L.) as a model plant because of its fast growth and genetic homogeneity. Additionally, fruits can be harvested after 30 days of cultivation, and is a plant able to absorb large amounts of phosphorus from the soil [27].

Table 2 displays the averages results of some biometric parameters corresponding to plants height, number of leaves, leaf area, main root length and dry weight.

Plant height

After 25 days of the trial, a better plant growth was evident in treatments T2 (bioinoculant with the *E. cloacae* *Z₃₂* isolate, 10⁶ c.f.u./mL) and T7 (commercial synthetic mineral fertilizer). They had the greatest heights, without significant differences between them. However, in the second evaluation (50 days after planting), growth of T7 plants increased, and their differences became statistically significant compared to the other treatments.

Number of leaves

Regarding the number of leaves, no significant differences were observed after 25 days between the chemical fertilizer and bioinoculants treatments. Nevertheless, there were statistically significant differences

Table 2. Effect of bioinoculants *Z₃₂* and *Z₄₂* in growth and development of radish plants (*Raphanus sativus* L.)

Treatments*	Plant height (cm)		Number of leaves		Leaf area (cm ²)		Length of the main root (cm)	Dry weight (g)
	25 days	50 days	25 days	50 days	25 days	50 days	50 days	
T0	7.82 ^{AB}	11.45 ^B	3.53 ^B	5.66 ^A	26.04 ^B	55.30 ^B	6.97 ^B	0.76 ^{AB}
T1	7.65 ^{AB}	11.89 ^B	4.40 ^{AB}	6.13 ^A	31.78 ^{AB}	76.35 ^B	7.64 ^{AB}	1.01 ^A
T2	8.31 ^{AB}	11.51 ^B	4.66 ^{AB}	5.20 ^A	37.20 ^{AB}	76.89 ^B	8.16 ^{AB}	0.66 ^B
T3	7.59 ^{AB}	12.06 ^B	4.73 ^{AB}	5.80 ^A	37.75 ^{AB}	74.40 ^B	9.35 ^{AB}	0.78 ^{AB}
T4	7.20 ^{AB}	10.82 ^B	4.60 ^{AB}	5.73 ^A	34.29 ^{AB}	68.13 ^B	9.01 ^{AB}	0.66 ^B
T5	6.92 ^B	12.60 ^B	4.53 ^{AB}	6.00 ^A	32.49 ^{AB}	76.56 ^B	9.03 ^{AB}	0.94 ^A
T6	7.39 ^{AB}	11.12 ^B	4.46 ^{AB}	5.53 ^A	31.99 ^{AB}	66.46 ^B	10.48 ^A	0.78 ^{AB}
T7	9.16 ^A	17.32 ^A	4.86 ^A	6.00 ^A	52.06 ^A	126.15 ^A	9.53 ^{AB}	1.03 ^A

* Treatments: T0: control without bioinoculant, T1, T2 and T3: bioinoculant *Z₃₂* (*Enterobacter cloacae*), 10⁶, 10⁷ and 10⁸ c.f.u./mL, respectively, T4, T5, T6: bioinoculant *Z₄₂* (*Klebsiella oxytoca*), 10⁶, 10⁷ and 10⁸ c.f.u./mL, respectively; T7: commercial synthetic mineral fertilizer containing P₂O₅. Each dose was determined from soil analysis.

^{A,B} Similar letters mean that there are no significant differences with a 5 % probability, according to Tukey's test, from a completely randomized design. The data represent the average of 15 replicates. Statistical comparisons were independent each time for each variable.

20. Hernández A. Obtención de un bio-preparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) [Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana; 2002.

21. Apiweb™ [Internet]. bioMérieux Clinical Diagnostics. Marcy l'Etoile: bioMérieux S.A.; c1996-2013 [cited 2013 Aug 8]. Available from: http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_12

22. Ramírez PR, Pérez MI. Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanus sativus* L.). Rev Fac Nal Agr Medellín. 2006;59(2):3543-56.

23. Coraspe HM, Tejera S. Procedimiento para toma de muestra de suelo. Revista Fonaip Divulga. 1996;(54):23-5.

24. López M, Martínez R, Brossard FM, Bolívar A, Alfonso N, Alba A, et al. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. Agronomía Trop. 2008;58(4):391-401.

25. Fernández LA, Zalba P, Gomez MA, Sagardoy MA. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Cienc Suelo. 2005; 23(1):31-7.

26. Gupta R, Singal R, Shankar A, Kuhad RC, Saxena RK. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. J Gen Appl Microbiol. 1994; 40:255-60.

27. Hewitson JF, Price R. Plant mineral nutrition in classroom: the radish, *Raphanus sativus* L. is a good plant for such studies. School Sci Rev. 1994;76(274):45-55.

between treatment T7 (commercial chemical fertilizer) and control. In the second evaluation (50 days), all treatments were statistically similar.

Leaf area

At 25 days, although the leaf area of plants treated with fertilizer (T7) was higher, there were no significant differences compared to that of plants treated with bioinoculants. However, after 50 days, the T7 significantly outperformed other treatments. The leaf area of bioinoculant-treated plants was greater than the control. Positive results in radish plants show that inoculation with native microorganisms stimulated the development and growth of the aerial parts of the plants.

This has been reported in other studies pointing out that growth-promoting rhizobacteria as corn plants, with further development of its aerial parts [28, 29]. Moreover, it has been shown that these microorganisms secrete substances that regulate plant growth, since they produce enzymes such as phytase and acid phosphatases, substances that increase soluble phosphorus in soil, stimulate root growth and promote sprouting on different plant species [30, 31].

Taproot length

At 50 days, the T6 (bioinoculant with Z_{42} isolated from *K. oxytoca*, 10^8 c.f.u./mL) stimulated the length of the main root, with statistically significant differences compared to the other treatments, including chemical fertilizer and control. The taproot length of inoculated plants was higher than that of plants under control treatment (Table 1).

Treatments increased the efficiency of nutrient uptake that affects plant growth. These results are probably due to production of native inoculants' phytohormones as auxins and gibberellins, which stimulate the growth, development and enlargement of the root system. Another group [32] described that about 80 % of the isolated strains of *Klebsiella* sp. were also able to fix nitrogen, adhere and colonize the roots, causing an alteration in taproot morphology and increasing the amount of root hairs and the production of bioactive substances (as auxins). Moreover, other reports have demonstrated that the most important plant hormone produced by *Klebsiella* sp. is the auxin indole acetic acid (IAA), which causes morphological changes in the main root. This compound has also been associated with the absorption of minerals, since it promotes a higher biomass production by plants [33-35].

Dry weight

T1 treatment (with bioinoculant Z_{32} , *E. cloacae*, 10^6 c.f.u./mL), T5 (with bioinoculant Z_{42} , *K. oxytoca*, 10^7 c.f.u./mL) and T7 (commercial chemical fertilizer) displayed the best results in regard to radish dry matter. These two treatments were statistically different from

the others under study. Bioinoculant treatments T1 and T5 were similar to treatment with mineral fertilizers (T7) in which the benefit of the native phosphate solubilizing bacteria must be highlighted.

The phosphate uptake by plants contributes to increase metabolism, reflected in a higher content of plant organic matter. The assimilation of a great amount of phosphorus positively influences the rapid root formation and growth at seedling stage, accelerates ripening, stimulates fruit coloring and helps seed formation. Besides, it is a component of nucleic acids, phospholipids (essential components of the cell membrane) and the energy transfer molecules such as adenosine triphosphate [36-38].

From the agronomical point of view is very important to notice that plants inoculated with native bacteria were healthy and more vigorous than controls. Interestingly, bacteria of the genera *Enterobacter* sp. and *Klebsiella* sp. are not typical biological control agents. Nevertheless, they can be considered rhizo-competent microorganisms able to form large populations under certain favorable conditions or some preferential substrates. Then, these genera could displace other microorganisms, including pathogens and in this process, reduce the occurrence of disease and influence the healthy growth and development of plants [39].

Coincidentally, in a previous study of our group, an *E. cloacae* isolate from the Department of Córdoba, next to Sucre, showed a high phosphate solubilizing ability in vitro [40]. This could lead to further studies on the use of bacteria of wider geographic distribution and displaying high phosphate solubilizing activity for scale up as bioinoculants, without the risk of altering the soil native microbiota.

In summary, the results of this study showed that inoculation of radish (*R. sativus* L.) plants with native phosphate solubilizing bacterial isolates of *E. cloacae* (isolate Z_{32}) and *K. oxytoca* (isolate Z_{42}), obtained from soils of the Department of Sucre (Colombia), have beneficial properties for sustainable agriculture with a positive impact on plant growth and development. Bioproducts from the studied strains could be very useful for regional culture inoculation since they may increase the rhizosphere microbial population and contribute to plant nutrition. In turn, the bioinoculants can be an alternative to the use of chemical fertilizers and become in a vital component of sustainable agricultural systems. They are economical and environmentally attractive, would reduce external inputs, improve the quality and production of crops and help to preserve the environment.

The use of beneficial microorganisms as *Enterobacter* sp. and *Klebsiella* sp. can become in a short time, an economical attractive choice to chemical fertilizers on crops of interest, due to their properties to solubilize phosphate deficient soils and improve those deficient in this macronutrient.

28. Mayak S, Tirosh T, Glick B. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem.* 2004;42(6):565-72.

29. Santillana N. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecol Apl.* 2006;5(1-2):87-91.

30. Martínez SM, Martínez GA. Effects of phosphate-solubilizing bacteria during the rooting period of sugar cane (*Saccharum officinarum*), Venezuela 51-71 variety, on the grower's oasis substrate. In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C, editors. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Salamanca, Spain, 16-19 July 2002. Dordrecht: Springer; 2007. p. 317-23.

31. Valero NO. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociados a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) [Tesis de Maestría Interfacultades en Microbiología]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2003.

32. Hahtela K, Rönkkö R, Laakso T, Williams PH, Korhonen TK. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: characterization of an iron-scavenging system and a substance stimulating root hair production. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1990;3:358-65.

33. El-Khawas H, Adachi K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol Fert Soils.* 1999;28(4):377-81.

34. Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(4):487-506.

35. Kämpfer P, Ruppel S, Remus R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol.* 2005; 28(3):213-21.

36. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, editors. Brock: Biología de los microorganismos. 10 ed. Madrid: Pearson-Prentice Hall; 2003.

37. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiología. 5 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2004.

38. Microbiología General [Internet]. Granada: Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada; c2005. [cited 2013 Aug 14]. Available from: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm>

39. Bashan Y, De-Bashan LE. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(6):2637-43.

40. Lara C, Esquivel Avila LM, Negrete Peña, JL. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Rev Bio Agro.* 2011;9(2):114-20.

Received in March, 2013.

Accepted in June, 2013.