

# CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PARA LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLÁNTULAS DE HORTALIZAS

## CHARACTERIZATION OF BACTERIA WITH POTENTIAL FOR PLANT GROWTH PROMOTION IN VEGETABLE SEEDLINGS

Castelblanco, A.N.<sup>1</sup>  
Lozano, L.C.<sup>2</sup>

### Resumen

Con el uso constante de fertilizantes químicos en la actividad agrícola se han producido algunos problemas de contaminación, daños en la salud humana, deterioro de suelos y pérdida de la biota microbiana que se encuentran en la tierra.

De ese modo, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son una vía para el desarrollo de biofertilizantes, debido a que presentan características como la fijación simbiótica de nitrógeno y la solubilización de fosfato. Por lo tanto logran disminuir el consumo de fertilizantes químicos y contribuyen al manejo sustentable de la producción agrícola, mejorando la calidad del suelo y el ciclado de nutrientes.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es caracterizar las bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas en la finca La Loma Verde Santa Lucía, ubicada en Guasca Cundinamarca y determinar cuál es su influencia en el desarrollo de lechuga y acelga hasta estado de plántula. Para ello, las

bacterias aisladas que presenten la propiedad de fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar fosfatos serán inoculadas en semillas de *lactuca sativa* (lechuga) y *beta vulgaris* (acelga) para evaluar el desarrollo de las plántulas. Se espera entonces que las bacterias aisladas y caracterizadas promuevan el crecimiento vegetal de estas dos hortalizas, para que en un futuro se pueda incentivar el uso de dichas bacterias en técnicas de producción de cultivos en Guasca, Cundinamarca.

**Palabras claves:** hortalizas. rizobacterias. biofertilizantes.

### Abstract

Promoting bacteria plant growth, they are a way for the development of bio-fertilizers because they have characteristics as symbiotic nitrogen fixation and phosphate solubilization, decreasing the consumption of chemical fertilizers therefore can contribute to the sustainable management of production agriculture, improve soil quality and nutrient cycling by microbial action. The agricultural activad with

<sup>1</sup> Semillerista del programa de Biología. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia. acastelblanco03@unisalle.edu.co

<sup>2</sup> Microbióloga, PhD. Profesora asociada. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.

constant use of chemical fertilizers has brought pollution problems, damage to human health, damage and loss of soil microbial biota found there. The use of bacteria with potential plant growth represent an alternative use to replace chemicals and help plant growth .For above the goal of this study it is to characterize the plant growth promoting bacteria isolated in the La Loma Verde Santa Lucia in Cundinamarca, Guasca and determine their influence on the development of lettuce and spinach until seedling stage.

For this purpose, the isolated bacteria that exhibit the property of fixing atmospheric nitrogen and solubilization of phosphates will be inoculated in the seeds of *lactuca sativa* (lettuce) and *beta vulgaris* (beet) to assess the development of seedlings. Waiting resulting bacteria isolated and characterized promote plant growth of these two vegetables so that the future can encourage the use of these bacteria in techniques in crop production in Cundinamarca, Guasca.

**Keywords:** Vegetables, PGPB, Biofertilizers.

## I. INTRODUCCIÓN

El aumento de la producción agrícola y el comercio exitoso de las hortalizas ha requerido de la adición de fertilizantes químicos para garantizar el crecimiento, el desarrollo vegetal y la productividad del cultivo. Esto debido al deterioro del suelo, pérdida de la biodiversidad, la agilidad en la venta y consumo de los productos agrarios (Portnov, Safriel 2004. Sáenz, 2006). Sin embargo, un 50% de los fertilizantes químicos aplicados son tomados por la planta, mientras que el restante queda en el suelo y son lixiviados a cuerpos de agua, causando así pérdidas económicas y contaminación ambiental (Saikia y Vanita, 2007).

La urea es uno de los fertilizantes nitrogenados más utilizados en la zona del municipio de Guasca, Cundinamarca. Se obtiene por medio de la combinación del dióxido de carbono con el amoníaco. Otro fertilizante utilizado es el triple 15 que permite tener una fuente óptima de los tres macro nutrientes primarios: N-P-K, mientras que el 10-30-0 presenta una proporción de contenidos de nitrógeno y fósforo N-P (Vega, 1985).

El uso de estos fertilizantes químicos y otros agroquímicos han impactado la salud de los seres humanos (Castañeda, 1995), pues son causantes de algunas enfermedades en los sistemas respiratorio, inmunitario y endocrino, además de ser causantes de daños cerebrales; en el sistema nervioso y en el hígado. Producen también defectos de nacimiento y esterilidad causados por el contacto o inhalación. (McTainsh 1986; Ortega-Rubio et al. 1998; Wang et al. 2004).

Así mismo, dichos fertilizantes ejercen efectos nocivos en las aguas superficiales y subterráneas, en el suelo y el subsuelo; en la flora y fauna. Por ejemplo causan daños en las plantas ocasionando que se reduzca su crecimiento, generan pérdida de la coloración natural de sus hojas y flores y reducen la proliferación de frutos. Todo esto conlleva a que la producción de cultivo pierda su atractivo a la hora de comercializarla (Freyre, 1997).

En cuanto a la biota microbiana que se encuentra en el suelo, el uso de los fertilizantes químicos produce un cambio en los ecosistemas, modificando las poblaciones microbianas que en su mayoría presentan una asociación con la planta ayudándole en su crecimiento y desarrollo (Echegaray A, 1995).

Dadas las consecuencias del uso de los fertilizantes químicos, el desarrollo de la producción agrícola de la mano de la biotecnología, ha generado nuevas prácticas que mejoran la estructura y la calidad del suelo. Técnicas asociadas al rendimiento de la producción de cultivos basados en la biota microbiana que tiene el suelo y la planta (Faz, 1991). Las líneas de investigación llevan a analizar la biodiversidad de algunos microorganismos y se encuentran asociadas con el ciclado de nutrientes del suelo y la acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Vega 1985). Así mismo, las poblaciones de artrópodos y anélidos ayudan a la degradación de materia orgánica y mantenimiento del suelo estable. Todo lo anterior pretende mejorar las condiciones necesarias para la producción agrícola y dejar atrás el uso excesivo de insumos químicos. (Richardson, 2009).

Por su parte, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen la capacidad de estimular directamente el desarrollo de las plantas, a través de diferentes mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. También pueden producir sustancias reguladoras de su crecimiento, incrementar el volumen de la raíz, tallo y otros órganos como flores y hojas (Arshad y Frankenberger, 1998). Las bacterias ayudan además a solubilizar minerales como el fosfato e inhiben el crecimiento de patógenos en el suelo que afectan las plantas (Utkhede et al., 1999) y presentan interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan et al., 1996).

Las hortalizas en la producción agrícola presentan un alto nivel de consumo en la canasta familiar colombiana. En los últimos tiempos se han visto beneficiadas en los nuevos sistemas de agricultura orgánica como medio para proveer un mejor alimento y un mejor producto al consumidor (Payne, 1997). Este hecho facilita la biodiversidad del suelo, lo cual ayuda a mantener el equilibrio del agro ecosistema (Ingham, 1997). Los productos como la lechuga, acelga, perejil, remolacha, repollo y zanahoria se producen en nuestro país a gran escala, ya que son productos de consumo de la canasta familiar.

Así, cada día se incrementa el empleo de microorganismos fijadores de nitrógeno simbóticos y que a la vez son productores de sustancias promotoras de crecimiento vegetal como inoculantes; las bacterias del género *azotobacter* han demostrado un aumento significativo en el rendimiento de los cultivos de leguminosas y hortalizas, lo cual permite el ahorro de fertilizantes minerales y la contribución con la

preservación del medio ambiente (Singh, 2003).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es:

Caracterizar las bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas en la finca La Loma Verde Santa Lucía en Guasca, Cundinamarca y determinar su influencia en el desarrollo de lechuga y acelga hasta estado de plántula.

## **METODOLOGÍA**

### **Lugar de muestreo**

El estudio se realizó en el municipio de Guasca, Cundinamarca, en la finca La Loma, vereda Santa Lucía. La zona cuenta con una temperatura media de 13°C. En una parte de la finca se realizan actividades de producción y comercialización de plantas ornamentales y en la otra, donde se llevó cabo el muestreo de suelo, no se realizan actividades productivas, es decir no se llevan a cabo prácticas agrícolas. De ese modo, se encuentra ocupado con cultivos de especies gramíneas, leguminosas y asteráceas.

### **Muestreo del suelo**

Se realizó la extracción de 5 de suelo a una profundidad de 5 cm. en un área de 60 m<sup>2</sup>. El muestreo se ejecutó en forma de zigzag, según la metodología de Martyniuk, (2002) y Tejera (2005).

Las muestras compuestas tomadas se empacaron en bolsas plásticas, con cierre hermético. Posteriormente se almacenaron y transportaron en neveras de icopor a temperatura ambiente (Torres, 2000).

## **Procesamiento de las muestras y aislamiento primario de bacterias**

Una vez en el laboratorio, las muestras se dividieron en sub-muestras, para su análisis fisicoquímico y microbiológico.

Para aislar las bacterias de las muestras tomadas en la finca La Loma, se pesó 1 gr de suelo y se adicionó a un tubo de ensayo con 9 mm de agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas para sembrar en cajas de Petri con agar ashby. Los cultivos se incubaron a 30° C por 5 días.

## **Aislamiento secundario de las bacterias**

Se realizó el aislamiento secundario, a partir de las colonias obtenidas en el aislamiento primario. Para ello se realizó una siembra por agotamiento de las colonias en agar ashby y se incubaron durante 5 días a 30°C. Posteriormente se determinó la morfología macroscópicas de las colonias y microscópicas de las células (Tejera, 2005).

## **Conservación de los aislamientos**

A Partir de las cepas aisladas y evaluadas, se realizarán cultivos en agar nutritivo y se incubaran a 30°C por 2 días.

Los cultivos se depositaran en tubos estériles de Eppendorf de 1.5 ml con un 10% v/v de glicerol y se congelara a -70° (C) para pruebas posteriores (Aquilantil L, 2004; Poutou R 1994).

## **Determinación de bacterias solubilizadoras de fosfato**

Para la determinación de las bacterias que solubilizan fosfatos se sembrarán las colonias de las cepas ya almacenadas y

caracterizadas por morfología microscópica, en cajas de petri en un medio de SRS, el cual contiene sales de fosfato de calcio y púrpura de bromocresol como indicador de PH. Se encubarán 5 días a 30° (C) y se seleccionaran las colonias de bacterianas que crecieron acidificando el medio de cultivo y formando un halo transparente alrededor de la colonia, indicando la actividad solubilizadora. La prueba se realizará por triplicada de cada uno de los aislamientos secundarios realizados, escogiendo las cepas que mayor diámetro presenten en los halos y en la solubilización del fosfato (Rigde E, Rovira A, 1971).

## **Bioensayos para la estimación del crecimiento de las plántulas de lechuga y acelga**

Se seleccionarán las cepas que crezcan en medio libre de nitrógeno y que solubilicen fosfatos para ser inoculadas en semillas de lechuga y acelga, determinando la influencia de las bacterias seleccionadas para estimular el crecimiento de las plántulas.

Las semillas certificadas de lechuga y acelga se obtendrán en un establecimiento comercial. Posteriormente serán lavadas y desinfectadas, sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 0,8% y se agitarán de forma constante durante 15 minutos. A continuación se lavarán 3 veces con abundante agua destilada estéril.

En cajas de petri, cada una con papel filtro se pondrán por aparte 10 semillas de lechuga y 10 de acelga, a una distancia de 2 cm entre cada semilla. De manera paralela y como prueba control se probarán las semillas de las mismas especies con el fertilizante químico 10-30 y un control negativo con agua destilada (Madigan et al., 1998).

Para la inoculación de las semillas de lechuga y acelga se cultivarán las bacterias en caldo nutritivo, se centrifugarán y se introducirán en solución salina. Posteriormente se dejarán las semillas, por media hora en la suspensión. Las cajas se dispondrán a temperatura ambiente. Se realizará un control diario de las semillas. Después, las plántulas se trasplantarán a unas cubetas con tierra estéril para el crecimiento. Al cabo de un mes se determinará el área foliar, la longitud de tallo y raíz, peso seco y fresco de la plántulas para ser comparadas con los tratamientos de control y determinar la viabilidad del uso de las bacterias aisladas.

### Análisis estadístico

Se realizará un diseño al azar con cuatro repeticiones, con el fin de determinar el factor de eficiencia de las bacterias que presentan las características de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno. Así mismo estas serán comparadas con los controles y finalmente se realizarán pruebas de Tukey al 5% de significancia y así determinar el valor de comparación.

### RESULTADOS PRELIMINARES Y DISCUSIÓN

Se tomaron 5 muestras de suelo en La finca Loma verde Santa Lucía en Guasca, Cundinamarca, las cuales fueron procesadas para el aislamiento primario de las bacterias. Después de 5 días de incubación se clasificaron los aislamientos por morfotipos, de acuerdo con la morfología de las colonias que se encontraban en cada caja. En la figura 1 se observa que las muestras 1, 2 y 5 presentan los mayores números de morfotipos de bacterias.

En el primer aislamiento con la siembra de los microrganismos en un medio libre

de nitrógeno (medio *ashby*) se obtuvo una diversidad de bacterias con 29 morfotipos dentro de las 5 muestras tomadas (figura 1). Para el aislamiento secundario se mantuvo el mismo medio, lo cual indica que las bacterias que crecieron presentan la capacidad para fijar nitrógeno (Monteiro, 2008).

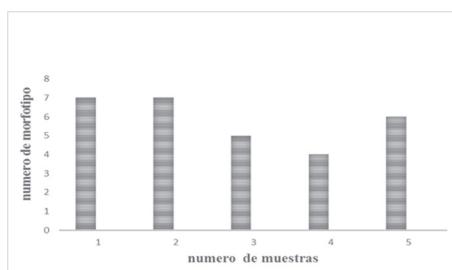


Figura 1. número de morfotipos aislados, tomados a partir de las muestras de suelo, de la finca la Loma verde de Santa Lucía en Guasca, Cundinamarca.

Estos resultados determinan que, dentro de la biota microbiana que poseen las muestras de suelo tomadas en la finca La Loma se pueden encontrar microorganismos, capaces de ayudar en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Döbereiner y Day, 1975).

La zona donde se realizó el aislamiento de las bacterias presentes en el suelo no ha sido utilizada para la producción agrícola. Inicialmente las pruebas para determinar el efecto de las bacterias aisladas se realizarán en condiciones de laboratorio. Se espera que en un futuro sea posible producir un cultivo de hortalizas de lechuga y acelga manejadas por medio de biofertilizantes, producidos a partir de las bacterias aisladas y caracterizadas en este estudio, ya que la

zona del municipio de Guasca aún no ha incursionado en el uso de biofertilizantes (Benerjee 1999, Maroni et al. 1999).

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen el apoyo financiero de la empresa Ecoambithoz Ltda. y la colaboración de la finca Loma verde Santa Lucía en Guasca, Cundinamarca para realizar la toma de muestras del suelo. A la Universidad de la Salle por el préstamo de equipos y el material de apoyo de laboratorio para la realización de este proyecto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquilantil L, Favilli F & Clemeti. F. (2004); A comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of Azobacter from soil samples. *Biology & Biochemistry*, Vol. 36. 1475 – 1483.
- Arshad, M. y W.T. Frankenberger Jr. (1998). Plant growth regulating substances in the rhizosphere; Microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 45-151.
- Bashan, Y., G. Holguín y R. Ferrera-Cerrato. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos II. Bacterias asociativas de la rizosfera. *Terra* 14: 195-210.
- Benerjee, B. D. (1999). The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemical. *Toxicology Letters*. 107:21-31.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Döbereiner, J. y J.M. Day. (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. p 39-56. In: Stewart, W.D.P (ed.). *Nitrogen fixation by free-living microorganisms*. International Biological Prog. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Echegaray A. (1995). El ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. pp. 7-35. In: Ferrera-Cerrato, R y J. Pérez M. (eds.). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Freyre, E. F. (1997). *Sociología rural y sustentabilidad ambiental de la Agricultura: Síntesis de una experiencia docente. Agroecología y Agricultura sostenible*, Modulo 3, La Habana, p. 2-5.
- Ingham, E. (1997). *Life in the soil. Understanding the soil foodweb*. Acres U.S.A. January.
- Madigan, M.T. Martinko, J.M. Parker, J. (1998). *Brock Biology of microorganisms*. PrenticeHall. Iberia, Madrid.
- Maroni, M., A. Fait & C. Colosio. (1999). Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides. *Toxicology Letters*, 107:145- 153.
- Martyniuk S. (2002) Ocurrence of Azotobacter Spp in some polish soils. *Polish journal of Environmental Studies* vol 12, p 371- 374.
- Mendez M.O., Neilson J.W., Maier R.M. (2008). Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. *Appl Environ Microbiol.* 74: 3899-3907.
- Monteiro RA, Schmidt MA, Baura VA, Balsanelli E, Wassem R, et al. (2008). Early colonization pattern of maize

- (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). *Genet Mol Biol*, 31: 932-937
- Payne, N. (1997). Encuesta al consumidor urbano de Costa Rica sobre la demanda de productos orgánicos. Sin publicar.
- Portnov Safran U.N. (2004). Combating desertification in the Negev: dryland agriculture vs dryland urbanization. *J Arid Environ*. 56: 659-680.
- Poutou R; Amador E. & Candelario M, (1994). Banco de Células Primario (BCP) Características y papel en la producción de proteína recombinantes. *Biotecnología Aplicada*, Vol No 1, p 55-59.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339.
- Rigde E, Rovira A, (1971). Phosphatase activitt of intact young wheat roots under sterile and non sterile conditions.
- Sáenz, L, (2006). Nutrición orgánica y tratamiento de desechos biodegradables. En: Documentotécnico. <<http://www.engormix>
- Saikia, Vanita J, (2007). Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma. *Current science* 92(3):317-322.
- Singh, R., Singh, D., Tyagi, P. K. (2003). Effect of Azotobacter, farmyard manure and nitrogen fertilization on productivity of pearl millet hybrids (*Pennisetum glaucum* (L) r.br) in semi-arid tropical environment. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 49 (1): 21-24.
- Sturm, H. Rangel, (1985). *Ecología de los Páramos: Una visión preliminar*. Universidad Nacional de Colombia.
- Tejera N, Iluch, (2005). Isolation and characterization of Azobacter and Azospirillum stains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*. vol 27, p 223-232.
- Torres M, (2000). Isolation of enterobacteria Azobacter sp and pseudomonas sp Producers of indole 3-acetic acid sideropheres from Colombia. *Rice Rhizosphere*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol 42, p 171-176.
- Utkhede, R.S., C.A. Koch y J.G. Menzies. (1999). Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 265-271.
- Vega, S. (1985). *Toxicología I: Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, p 69.
- Velázquez, (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.