

## Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero\*

### Inoculation with plant growth promoting bacteria on tomato under greenhouse conditions

Diana Beatriz Sánchez López<sup>1§</sup>, Ruth Milena Gómez-Vargas<sup>1</sup>, María Fernanda Garrido Rubiano<sup>1</sup> y Ruth Rebeca Bonilla Buitrago<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología de Suelos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Vía Mosquera-Cundinamarca, Colombia, km 14. Tel. (057) 4227300. Ext. 1401, (rgomezv@corpoica.org.co; mgarrido@corpoica.org.co; rbonilla@corpoica.org.co). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: dbsanchez@corpoica.org.co.

#### Resumen

El incremento en la población mundial ha aumentado la demanda de alimentos y así mismo la demanda de fertilizantes químicos los cuales no sólo son costosos sino también contaminantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de varias cepas candidatas a promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento y producción del cultivo del tomate. El estudio se realizó en 2010, en el Centro de Investigación Tibaitatá (Corpoica) ubicado en Mosquera (Cundinamarca- Colombia). Se emplearon las cepas TVL-1 y TVL-2 que se encuentran identificadas como *Enterobacter* sp., además las cepas *Pseudomonas* sp. PSO13, PSO14, y *Bacillus* sp. BEOO2 y BEOO3. Los resultados demostraron la capacidad intrínseca de las cepas para solubilizar una fuente de fósforo poco soluble donde la utilización de las cepas TVL-1, TVL-2 y PSO14 evidenciaron los mejores resultados. Las cepas TVL-1, TVL-2 y PSO13 presentaron actividad fosfatasa. Adicionalmente, las bacterias fueron capaces de producir indoles y sideróforos bajo las condiciones evaluadas. El experimento en invernadero evidenció que las cepas TVL-2 y PSO14 incrementaron de manera significativa la biomasa y desarrollo de la planta ( $p \leq 0.05$ ) así como el rendimiento en la producción de frutos lo que se puede asociar a las capacidades bioquímicas asociadas a promoción de crecimiento vegetal evaluadas en el laboratorio.

#### Abstract

The increase in world population has also increased the demand for food and so does the demand for chemical fertilizers which are not only costly but also pollutants. The aim of this paper was to evaluate the effect of applying several candidate strains to plant growth promoters on growth and yield of tomato. The study was conducted in 2010, Tibaitatá Research Center (Corpoica) located in Mosquera (Cundinamarca, Colombia). The strains used were TVL-1 and TVL-2 identified as *Enterobacter* sp., also the strains *Pseudomonas* sp. PSO13, PSO14, and *Bacillus* sp. BEOO2 and BEOO3. The results demonstrated the intrinsic ability of the strains to solubilize a poorly soluble phosphorus source where the use of the strains TVL-1, TVL-2 and PSO14 showed the best results. The strains TVL-1, TVL-2 and PSO13 had phosphatase activity. Additionally, the bacteria were able to produce siderophore and indoles under the conditions evaluated. The greenhouse experiment showed that, the strains PSO14 and TVL-2 significantly increased biomass and plant development ( $p \leq 0.05$ ) as well as fruit yield production that can be associated with biochemical capabilities associated with promotion of plant growth evaluated in the laboratory.

\* Recibido: febrero de 2012  
Aceptado: agosto de 2012

**Palabras claves:** BPCV, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., biofertilizante.

**Key words:** *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., biofertilizer, PGPR.

## Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) es una de las hortalizas más difundidas en todo el mundo con alto valor económico, ya que representa 30% de la producción hortícola a nivel mundial (Mejía, 2007). Su demanda aumenta considerablemente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años, se debe principalmente al rendimiento e incremento de la superficie cultivada (Jaramillo *et al.*, 2007).

El fósforo (P), es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de las funciones básicas del metabolismo de las plantas (Fernández, 2007). Se trata de un componente esencial de moléculas como RNA y DNA, así como de fosfolípidos (Coney, 2000). Sin embargo, muchos suelos en todo el mundo son deficientes en P disponible para el crecimiento de las plantas encontrándose en forma de quelatos insolubles (Vassilev *et al.*, 2006), por lo que se utilizan grandes cantidades de fertilizantes de alta solubilidad, de los cuales una gran proporción es rápidamente transformada en la forma insoluble (Omar, 1998). Algunos microorganismos mejoran la disponibilidad de P para las plantas por mineralización de P orgánico en el suelo y la solubilización de fosfatos (Kang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006).

Éste grupo de rizobacterias pertenecen al grupo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) y entre ellas se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* entre otros. El mecanismo más común para la solubilización de fosfatos minerales es la producción los ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999), mientras que el fosfato orgánico es mineralizado por enzimas fosfatasa (Chen *et al.*, 2006). De esta forma el fósforo queda disponible en el suelo y finalmente es absorbido por las plantas y utilizado para su desarrollo (Kang *et al.*, 2002).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) y la capacidad

## Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) is one of the most widely used vegetables in the world with high economic value, accounting for 30% of horticultural production worldwide (Mejía, 2007). The demand is greatly increased and with it its cultivation, production and trade too. The annual in production increase in the recent years is mainly due to an increasing and yield of the cultivated area (Jaramillo *et al.*, 2007).

Phosphorus (P) is one of the most important nutrients for the development of the basic functions of the plant's metabolism (Fernández, 2007). This is an essential component of RNA and DNA molecules as well as phospholipids (Coney, 2000). However, many soils worldwide are deficient in available P for growth of the plants being in the form of insoluble chelates (Vassilev *et al.*, 2006), so that using large amounts of fertilizer high solubility, of which a large proportion is rapidly converted into insoluble (Omar, 1998). Some microorganisms improve P availability to plants by mineralization of organic P in soil and the phosphate solubilization (Kang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006).

This group of rhizobacteria belonging to the group of plant growth promoting bacteria (PGPR) and among them are the genera *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* and *Flavobacterium* among others. The most common mechanism for solubilization of phosphate rock is the production of organic acids (Rodríguez and Fraga, 1999), while the organic phosphate is mineralized by phosphatase enzymes (Chen *et al.*, 2006). In this way the phosphorus is available in the soil and is finally absorbed by the plants and used for their development (Kang *et al.*, 2002).

This paper aimed to evaluate the effect of inoculation of plant growth promoting bacteria on tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) and the physiological capacity of solubilization of both inorganic and organic phosphates, the production of total indole compounds and siderophores.

fisiológica de solubilización de fosfatos tanto inorgánicos como orgánicos, la producción de compuestos indólicos totales y sideróforos por parte de éstas.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en 2010, en el Centro de Investigación Tibaitatá (Corpoica) ubicado en Mosquera (Cundinamarca-Colombia), a una altura de 2543 m; localizado geográficamente a 4°41' 43" de latitud norte y 74°12' 30" de latitud oeste.

### Microorganismos y medios de cultivo

Las cepas *Pseudomonas fluorescens* PSO13, *Pseudomonas putida* PSO14, y *Bacillus* sp. BEOO2 y BEOO3, fueron proporcionadas por el banco de microorganismos del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA y las cepas de *Enterobacter* sp. TVL-1 y TVL-2 y *Enterobacter agglomerans* UV1 (Caballero *et al.*, 2007) fueron proporcionadas por el Banco de Microorganismos del Laboratorio de Microbiología de Suelos de CORPOICA. Las cepas fueron reactivadas en el medio de cultivo SRS modificado con roca fosfórica al 0.5% como fuente de fósforo (g/L: glucosa 10, extracto de levadura 0.5, NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.5, KCl 0.2, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.3. MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.004, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2, púrpura de bromocresol 0.1, agar 15.0, pH: 7.2) a 30 ± 2 °C durante 48 h.

Para la cuantificación de la producción de compuestos indólicos se empleó el medio de cultivo K-lactato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.96 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.67 g/L, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.29 g/L, NaCl 0.48 g/L, lactato de sodio 60% 17.1 mL/L, CaCl<sub>2</sub> 0.7% 10mL/L, FeCl<sub>3</sub> 7H<sub>2</sub>O 1% 1mL/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.5% 5mL/L, NH<sub>4</sub>Cl 20% 1mL/L, pH7). Para la determinación de la producción de compuestos tipo sideróforos se empleó el medio CAS (g/L: cromo azurol S (CAS) 0.06, solución de FeIII (1 mM FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O; 10 mM HCl) 10 mL, HDTMA 0.07; Agar Flo 37.00, glicerol, 10 mL, Pipes 30.24, pH 6.8) (Schwyn y Neilands, 1987)

### Roca fosfórica

La roca fosfórica empleada en el presente estudio es originaria de Pesca-Boyacá (Colombia) la composición es la siguiente: 30% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 40% Ca, 12% Si, 0.1% Mg, 40 ppm Mn, 30 ppm Cu, 10 ppm Mo, 300 ppm Zn y 3% de humedad.

## Materials and methods

The study was conducted in 2010, Tibaitatá Research Center (Corpoica) located in Mosquera (Cundinamarca, Colombia), at an elevation of 2543 m, located at 4° 41' 43" north latitude and 74° 12' 30" west latitude.

### Microorganisms and culture media

*Pseudomonas fluorescens* strains PSO13, *Pseudomonas putida* PSO14, and *Bacillus* sp. BEOO3 and BEOO2 were provided by the bank of microorganisms, Biological Control Laboratory CORPOICA and the strains of *Enterobacter* sp. TVL-1 and TVL-2 and *Enterobacter agglomerans* UV1 (Caballero *et al.*, 2007) were provided by the Bank of Microorganisms Laboratory of Soil Microbiology CORPOICA. The strains were revived in the culture medium amended with phosphate rock SRS 0.5% as a source of phosphorus (g/L: glucose 10, yeast extract 0.5, NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.5, KCl 0.2, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.3. MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.004, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2, purple bromocresol 0.1, agar 15.0, pH: 7.2) a 30 ± 2 °C for 48 h.

To quantify the production of indole compounds was employed the culture medium K-lactate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.96 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.67 g/L, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.29 g/L, NaCl 0.48 g/L, sodium lactate 60% 17.1 mL/L, CaCl<sub>2</sub> 0.7% 10mL/L, FeCl<sub>3</sub> 7H<sub>2</sub>O 1% 1mL/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.5% 5mL/L, NH<sub>4</sub>Cl 20% 1mL/L, pH7). For determination of the production of siderophore type compounds the culture CAS was used (g/L: cromo azurol S (CAS) 0.06, solution de FeIII (1 mM FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O; 10 mM HCl) 10 mL, HDTMA 0.07; Agar Flo 37.00, glicerol, 10 mL, Pipes 30.24, pH 6.8) (Schwyn y Neilands, 1987).

### Phosphate rock

The phosphate rock used in this study originates from Pesca-Boyacá (Colombia) the composition is as follows: 30% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 40% Ca, 12% Si, 0.1% Mg, 40 ppm Mn, 30 ppm Cu, 10 ppm Mo, 300 ppm Zn and 3% of moisture.

### Solubilization and mineralization of phosphorus

Three approaches were undertaken, a qualitative test, a quantitative determination of phosphatase enzyme activity.

### **Solubilización y mineralización de fósforo**

Tres aproximaciones fueron realizadas; una prueba cualitativa, una cuantitativa y la determinación de la actividad de la enzima fosfatasa.

#### **Evaluación cualitativa de la solubilización de roca fosfórica**

La evaluación cualitativa de la actividad biológica se realizó en agar SRSM-PR con púrpura de bromocresol (como indicador de cambio de pH del medio), se sembraron alícuotas de 50  $\mu$ L de suspensión bacteriana en NaCl al 0.85% ajustada a un  $OD_{600} = 0.500$  (ThermoSpectronic- Genesys 10uv). Todas las cepas fueron evaluadas y los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 48 h a  $30 \pm 2$  °C y se midieron los halos de solubilización y el diámetro de la colonia a las 24 y 48 h (Alikhani *et al.*, 2006).

#### **Evaluación cuantitativa de la solubilización de roca fosfórica**

La determinación cuantitativa de la solubilización de roca fosfórica en medio líquido se llevó a cabo en medio SRSM-PR con un tiempo de incubación de 12 días a  $30 \pm 2$  °C y 150 rpm (Labline Hertz 3525). La cuantificación del fósforo solubilizado se llevó a cabo con la técnica de azul de fosfomolibdeno (Fiske y Subbarow, 1925).

#### **Actividad enzimática**

La actividad de las enzimas fosfomonoesterasas se determinó por medio de la técnica del p-nitrofenil fosfato descrita por Tabatabai y Bremner (1969), para esto se empleó el medio SRSM sin fuente de fósforo y se realizó la lectura en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

#### **Síntesis de sideróforos**

Se realizó una suspensión bacteriana de cada una de las cepas en estudio en NaCl 0.85% a un  $OD_{600} = 0.200$ . Se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L de la suspensión, y se sembraron por triplicado sobre una placa de petri con agar CAS a razón de una microgota por caja, por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 48 h a  $30 \pm 2$  °C. Los resultados positivos se indican por el viraje de color de azul a amarillo alrededor del crecimiento bacteriano (Schwyn y Neilands, 1987).

### **Qualitative assessment of the solubilization of rock phosphate**

The qualitative evaluation of biological activity was performed on agar SRSM-PR with purple bromocresol (as an indicator of change in pH of the culture) planting aliquots of 50  $\mu$ L of bacterial suspension in 0.85% NaCl adjusted to an  $OD_{600} = 0.500$  (Thermo Spectronic-Genesys 10uv). All the strains were tested and the tests were performed for triplicate. The plates were incubated for 48 h at  $30 \pm 2$  °C and measured solubilization haloes and colony diameter at 24 and 48 h (Alikhani *et al.*, 2006).

#### **Quantitative evaluation of the solubilization of rock phosphate**

The quantitative determination of solubilization of phosphate rock in liquid culture was carried out in SRSM-PR with an incubation time of 12 days at  $30 \pm 2$  °C and 150 rpm (Hertz Labline 3525). The quantification of the solubilized phosphorus was made with the technique of blue phosphomolybdenum (Fiske and Subbarow, 1925).

#### **Enzymatic activity**

The phosphomonoesterases enzyme activity was determined through the technique of p-nitrophenyl phosphate as described by Tabatabai and Bremner (1969), for this the culture SRSM was used, with no source of phosphorus and readings were made in the stationary phase of bacterial growth.

#### **Synthesis of siderophores**

A bacterial suspension was made from each of the bacterial suspensions in 0.85% NaCl to an  $OD_{600} = 0.200$ . 10  $\mu$ L aliquots of the suspension, and plated in triplicate on an agar petri dish with CAS at a rate of one droplet per box, in triplicate. The plates were incubated for 48 h at  $30 \pm 2$  °C. Positive results are indicated by color change from blue to yellow around the bacterial growth (Schwyn and Neilands, 1987).

#### **Total production of indoles**

Indole compounds were estimated using the colorimetric assay described by Glickmann and Dessaux (1995) using the culture medium K-lactate supplemented with tryptophan

## Producción de indóles totales

Los compuestos indólicos se estimaron mediante el ensayo colorimétrico descrito por Glickmann y Dessaux (1995) empleando el medio de cultivo K-lactato suplementado con triptófano a 100 mg/L. Los cultivos se incubaron durante 72 h a 150 rpm en oscuridad y para la lectura se empleó el reactivo de Salkowsky ( $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  12g/L en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.9M) en una relación 1:1 con la suspensión bacteriana, dejándose reaccionar durante 30 min en oscuridad.

## Evaluación bajo condiciones de invernadero

Las raíces de las plántulas de tomate (variedad Sofía) fueron sumergidas en una suspensión bacteriana de 200 mL a una concentración de  $10^8$  UFC/mL en medio SRSM-RP durante 30 min y transferida a bolsas plásticas con capacidad de 2 kg. El suelo empleado fue sin esterilizar con un pH 5.9 y una textura franco limosa. El experimento se mantuvo bajo condiciones de invernadero por tres meses a una temperatura promedio mínima de 7 °C y máxima 37 °C, humedad de rocío y penetración de luz. Se realizaron muestreos destructivos cada mes durante tres meses. La fertilización biológica se realizó al primer y segundo mes de siembra con 1 mL de los inóculos. Se implementó un diseño completamente al azar, con siete tratamientos: T<sub>0</sub>= testigo absoluto, T<sub>1</sub>= testigo químico, T<sub>2</sub>= 1 mL de inóculo de TVL-1 y 50% de fertilización química, T<sub>3</sub>= 1 mL de inóculo de TVL-2 y 50% de fertilización química, T<sub>4</sub>= 1 mL de inóculo PSO13 y 50% de fertilización química T<sub>5</sub>= 1 mL de inóculo PSO14 y 50% de fertilización química T<sub>6</sub>= 1 mL de inóculo de BEOO2 y 50% de fertilización química T<sub>7</sub>= 1 mL de inóculo de BEOO3 y 50% de fertilización química T<sub>8</sub>= 1 mL de inóculo UV1 y 50% de fertilización química. Se emplearon tres repeticiones y tres unidades experimentales por repetición. Las variables evaluadas fueron: longitud de la parte aérea, longitud radical, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y producción de flores y frutos.

## Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a una evaluación estadística empleando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con 95% de confianza.

at 100 mg/L. Cultures were incubated for 72 h at 150 rpm in darkness and was used for reading Salkowsky reagent ( $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  12g/L in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.9M) in a 1:1 relation with the bacterial suspension, leaving to react for 30 min in darkness.

## Evaluation under greenhouse conditions

The roots of tomato seedlings (variety Sofía) were dipped in a bacterial suspension of 200 mL at a concentration of  $10^8$  CFU/mL in the culture SRSM-RP for 30 min and transferred to plastic bags with a capacity of 2 kg. The soil used was unsterilized at pH 5.9 and a silty loam. The experiment was maintained under greenhouse conditions for three months at a minimum average temperature of 7 °C and maximum 37 °C, humidity dew and light penetration. Destructive sampling was done every month for three months. Organic fertilization was made in the first and second month of sowing with 1 mL of inocula. We implemented a completely randomized design with seven treatments: T<sub>0</sub>= absolute control, T<sub>1</sub>= chemical control, T<sub>2</sub>= 1 mL of inoculum of TVL-1 and 50% of chemical fertilizer, T<sub>3</sub>= 1 mL of inoculum of TVL-2 and 50% of chemical fertilization, T<sub>4</sub>= 1 mL of inoculum of PSO13 and 50% of chemical fertilizer, T<sub>5</sub>= 1 mL of inoculum of PSO14 and 50% of chemical fertilizer, T<sub>6</sub>= 1 mL of inoculum of BEOO2 and 50% of chemical fertilizers, T<sub>7</sub>= 1 mL of inoculum of BEOO3 and 50% of chemical fertilizer, T<sub>8</sub>= 1 mL of inoculum of UV1 and 50% of chemical fertilizer. Three replicates were used and three experimental units per replicate. The variables evaluated were: length of the area, root length, dry weight of the aerial part, root dry weight and flower production and fruit.

## Statistical analysis

Data were subjected to statistical evaluation using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test with 95% confidence.

## Results and discussion

**Solubilization and mineralization of phosphorus. Qualitative assessment of the solubilization of rock phosphate.** The strains *Enterobacter* sp. TVL-2 and *P. putida* PSO14 had the highest rates of solubilization at 24 h,

## Resultados y discusión

**Solubilización y mineralización de fósforo. Evaluación cualitativa de la solubilización de roca fosfórica.** Las cepas *Enterobacter* sp. TVL-2 y *P. putida* PSO14 presentaron los mayores índices de solubilización a las 24 h, mientras que *Enterobacter* sp. TVL-1 y TVL-2 fueron las mejores transcurridas 48 h de incubación. Se observó que los índices de solubilización incrementaron con el tiempo (Cuadro 1).

whereas *Enterobacter* sp. TVL-1 and TVL-2 were the best after 48 h of incubation. It was observed that dissolution rates increased over time (Table 1).

The bacterial mechanism most associated to the solubilization of inorganic phosphorus is the biosynthesis of organic acids including citric acid, lactic, succinic, gluconic and 2-ketogluconic, among others (Rodríguez *et al.*, 2004 and Gupta *et al.*, 2007) that lower the pH or act as chelating agents, which is related to the decrease of pH

**Cuadro 1. Evaluación de la solubilización y mineralización de fosfatos.**  
**Table 1. Solubilization and mineralization of phosphates evaluating.**

Cepa bacteriana	Índice de solubilización				Fósforo soluble		Actividad enzimática
	24 h	pH 24 h	48 h	pH 48 h	mg/L	pH	(nM de p-nitrofenol)
TVL-1	1.5 ± 0.06 <sup>de</sup>	4.45 ± 0.10	5.00 ± 0.3 <sup>ab</sup>	4.14 ± 0.12	189.5 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.99 ± 0.23	0.136 ± 0.006 <sup>c</sup>
TVL-2	2.24 ± 0.21 <sup>ab</sup>	4.26 ± 0.05	4.07 ± 0.12 <sup>ab</sup>	4.05 ± 0.18	192.5 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.81 ± 0.20	0.538 ± 0.003 <sup>b</sup>
PSO13	1.78 ± 0.03 <sup>cd</sup>	5.55 ± 0.07	2.30 ± 0.17 <sup>cd</sup>	5.35 ± 0.11	133.0 ± 0.82 <sup>d</sup>	4.77 ± 0.10	0.015 ± 0.003 <sup>d</sup>
PSO14	2.08 ± 0.29 <sup>bc</sup>	4.32 ± 0.25	3.30 ± 0.31 <sup>bc</sup>	4.23 ± 0.12	144.0 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.85 ± 0.27	-
BEOO2	1.47 ± 0.06 <sup>e</sup>	5.89 ± 0.10	1.70 ± 0.09 <sup>de</sup>	5.70 ± 0.07	127.0 ± 0.22 <sup>c</sup>	5.21 ± 0.70	-
BEOO3	1.67 ± 0.14 <sup>cde</sup>	6.67 ± 0.18	2.33 ± 0.14 <sup>cde</sup>	6.28 ± 0.16	133.0 ± 0.07 <sup>bc</sup>	6.02 ± 0.68	-
UV1 Control	2.92 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.64 ± 0.23	4.00 ± 0.25 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.16	138.0 ± 0.13 <sup>cd</sup>	4.48 ± 0.27	-
DH5α control positivo fosfatasas	-	-	-	-	-	-	5.940 ± 0.043 <sup>a</sup>

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones. Para cada columna medias con igual letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

El mecanismo bacteriano que más se asocia a la solubilización de fósforo inorgánico es la biosíntesis de ácidos orgánicos entre los cuales se encuentran el ácido cítrico, láctico, succínico, glucónico y 2-cetogluconico, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2004 y Gupta *et al.*, 2007) los cuales disminuyen el pH o actúan como agentes quelantes, lo cual se encuentra relacionado con la disminución de pH encontrada en el presente estudio. La síntesis de ácidos orgánicos suele estar asociada al metabolismo de algunos carbohidratos, en este caso glucosa, la cual se metaboliza vía glucólisis y ciclo de Krebs (Gunnarsson *et al.*, 2004). Seshadri y Ignacimuthu (2002) reportaron índices de solubilización de  $2.05 \pm 4.11$

found in this paper. The synthesis of organic acids is usually associated with some carbohydrate metabolism, in this case glucose, which is metabolized via glycolysis and the Krebs cycle (Gunnarsson *et al.*, 2004). Seshadri and Ignacimuthu (2002) reported rates of  $2.05 \pm 4.11$  solubilization by *Pseudomonas* sp. and  $1.84 \pm 4.43$  by *Bacillus* sp., in Pikovskaya agar supplemented with 0.5%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , which agrees with the results of this investigation; however, it should be noted that tricalcium phosphate is 10 times more soluble than the phosphate rock, so the microbial activity is higher in the strains of this study because of the difficult solubility of the

por *Pseudomonas* sp. y  $1.84 \pm 4.43$  por *Bacillus* sp. en agar Pikovskaya suplementado con 0.5%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , lo cual concuerda con los resultados de esta investigación, sin embargo se debe tener en cuenta que el fosfato tricálcico es 10 veces más soluble que la roca fosfórica, por lo que la actividad microbiana es mayor en las cepas del presente estudio dada la difícil solubilidad de la fuente de fósforo empleada. De igual forma se ha reportado que microorganismos pertenecientes al género *Enterobacter* presentan importantes niveles de solubilización (Vassilev *et al.*, 1997 y Sharma *et al.*, 2011).

### Evaluación cuantitativa de la solubilización de roca fosfórica

Las cepas de *Enterobacter* sp. TVL-1 y TVL-2, presentaron los mejores resultados ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 1). Adicionalmente, se evidenció una correlación entre la solubilización de fósforo y el pH final del medio de cultivo, el cual fue acidificado en todos los casos ( $R = -0,67; p \leq 0.05$ ).

Yu *et al.* (2011) reportaron resultados similares a lo encontrado en el presente estudio con cepas de *P. chlororaphis*, *B. cereus* y *P. fluorescens*, siendo la fuente de fósforo fosfato tricálcico. Obtuvieron concentraciones de fósforo disponible entre 81.09 y 233.35 mg/L con una disminución significativa en el pH luego de 72 h de incubación. En el presente estudio se encontraron niveles de solubilización de hasta 144.0  $\pm$  0.04 mg/L en la cepa *P. putida* PSO14 pero empleando roca fosfórica con menor solubilidad que el fosfato tricálcico. En el caso de la cepa *Enterobacter* TVL-2 se presentó una solubilización de 192.5  $\pm$  0.14 mg/L lo cual comparado con lo encontrado por Vassilev *et al.* (1997) con una solubilización de hasta 400 mg/L con una roca con 28.9% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  es bajo; sin embargo, lo anterior puede estar relacionado con la solubilidad de la roca empleada, pues de este factor depende la cantidad de fósforo disponible ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) que puede ser liberado (Pérez y Smyth, 2005). Con relación a lo anterior, Sharma *et al.* (2011) encontró una solubilización de roca fosfórica de 92.6 mg/L por parte de una cepa de *Enterobacter asburiae*, siendo esta actividad menor a la encontrada en las cepas del presente estudio.

### Actividad enzimática de la fosfatasa

Los resultados evidenciaron que sólo las cepas *Enterobacter* sp. TVL-1 y TVL-2 y *P. fluorescens* PSO13 fueron capaces de sintetizar fosfatasas, siendo la cepa *Enterobacter* sp. TVL-2 la que presentó la mayor producción ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 1). La actividad de las fosfatasas depende de una

phosphorus source employed. Similarly it is reported that microorganisms belonging to the genus *Enterobacter* have significant levels of solubilization (Vassilev *et al.*, 1997 and Sharma *et al.*, 2011).

### Quantitative evaluation of the solubilization of rock phosphate

The strains of *Enterobacter* sp. TVL-1 and TVL-2 showed the best results ( $p \leq 0.05$ ) (Table 1). Additionally, a correlation was demonstrated between the solubilization of phosphorus and the final pH of the culture medium, which was acidified in all cases ( $R = -0,67; p \leq 0.05$ ).

Yu *et al.* (2011) reported similar results to those found in this study with strains of *P. chlororaphis*, *B. cereus* and *P. fluorescens*, being the source of phosphorus tricalcium phosphate. Phosphorus concentrations were available between 81.09 and 233.35 mg/L with a significant decrease in pH after 72 h of incubation. In the present study, we found levels of solubilization of up to 144.0  $\pm$  0.04 mg/L in the strain *P. putida* PSO14 but using phosphate rock with lower solubility than tricalcium phosphate. In the case of the strain *Enterobacter* TVL-2 showed a solubility of 192.5  $\pm$  0.14 mg/L. This compared with what was found by Vassilev *et al.* (1997) with a solubilization of up to 400 mg/L with a rock with 28.9%  $\text{P}_2\text{O}_5$  is low, but this may be related to the solubility of the rock used, as this factor depends on the amount of phosphorous ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) that can be released (Pérez and Smyth, 2005). In this respect Sharma *et al.* (2011) found a rock phosphate solubilization of 92.6 mg/L by a strain of *Enterobacter asburiae*, being this activity lower than those found in the strains of this study.

### Phosphatase enzyme activity

The results showed that only the strains *Enterobacter* sp. TVL-1 and TVL-2 and *P. fluorescens* PSO13 were able to synthesize phosphatases, being the strain *Enterobacter* sp. TVL-2 which had the highest production ( $p \leq 0.05$ ) (Table 1). The phosphatase activity depends on a large number of environmental factors among which are: the concentration of substrate and enzyme, the composition of the reaction medium, temperature, pH, ions, and inhibitors, among others. Similar results were reported by Park *et al.* (2010) who noted that, the activity of acid phosphatase produced by isolated bacteria ranged from 0.0034 to 0.1401 nM for *Pantoea* and *Enterobacter* as measured by

larga serie de factores medioambientales entre los que se encuentran: la concentración de sustrato y enzima, la composición del medio de reacción, la temperatura, el pH, los iones, e inhibidores, entre otros. Resultados similares fueron reportados por Park *et al.* (2010) quienes señalan en su estudio que la actividad de la fosfatasa ácida producida por las bacterias aisladas varió de 0.0034 a 0.1401 nM para géneros como *Pantoea* y *Enterobacter*, medido por la producción de p-nitrofenol. De acuerdo a lo anterior, la cepa *Enterobacter* sp. TVL-2 presentó una importante actividad con  $0.538 \pm 0.003$  nM.

### Síntesis de sideróforos

Las cepas *Enterobacter* sp. TVL-1 y TVL-2, *P. putida* PSO14 y *Bacillus* sp. BEOO2 y BEOO3 fueron capaces de producir este grupo de compuestos, evidenciando un incremento asociado al tiempo. La cepa que presentó mayor producción tanto a las 24 como a las 48 h fue la cepa *P. putida* PSO14 ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 2).

### Cuadro 2. Producción de sideróforos e indoles totales.

Table 2. Siderophore production and total indoles.

Cepa bacteriana	Halos de sideróforos (mm)		Producción de indoles totales ( $\mu\text{g/mL}$ )
	24 h	48 h	
TVL-1	$2.33 \pm 0.57^b$	$12.3 \pm 0.57^b$	$24.61 \pm 0.73^{ab}$
TVL-2	$4.33 \pm 1.54^{ab}$	$14.7 \pm 1.00^{ab}$	$27.11 \pm 0.48^a$
PSO13	-	-	$24.29 \pm 2.33^{abc}$
PSO14	$5.67 \pm 0.57^a$	$17.3 \pm 1.52^a$	$22.14 \pm 1.48^{bcd}$
BEOO2	$4.33 \pm 1.52^b$	$12.3 \pm 0.57^b$	$18.43 \pm 0.61^d$
BEOO3	$3.00 \pm 1.00^b$	$12.7 \pm 1.52^b$	$19.97 \pm 3.21^{cd}$
UVI Control	$4.33 \pm 0.57^b$	$13.7 \pm 0.57^b$	$19.54 \pm 0.41^d$

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones. Para cada columna media con igual letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### Producción de indoles totales

Al evaluar la producción de compuestos indólicos se observó un comportamiento similar en todas las cepas evaluadas, presentado los mejores resultados las cepas de *Enterobacter* sp. TVL-2 y TVL-1 ( $p \leq 0.05$ ). (Cuadro 2). En general, la producción de auxinas por las bacterias, especialmente el ácido 3-indolacético, ha evidenciado influir significativamente sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Varios estudios han demostrado que la producción *in vitro* de AIA y otras hormonas fisiológicamente activas derivadas del L- triptófano, son una característica de las

the production of p-nitrophenol. According to these, the strain *Enterobacter* sp. TVL-2 showed significant activity with  $0.538 \pm 0.003$  nM.

### Synthesis of siderophores

The strains *Enterobacter* sp. TVL-1 and TVL-2, *P. putida* PSO14 and *Bacillus* sp. BEOO3 and BEOO2 were able to produce this group of compounds, showing an associated increase in time. The strain with increased production both at 24 and at 48 h was the strain *P. putida* PSO14 ( $p \leq 0.05$ ) (Table 2).

### Total production of indoles

By evaluating the production of indole compounds, similar behavior was observed in all the strains tested, presented the best results strains *Enterobacter* sp. TVL-1 and TVL-2 ( $p \leq 0.05$ ), (Table 2). In general, auxin production by bacteria, especially 3-indoleacetic acid, has shown to significantly

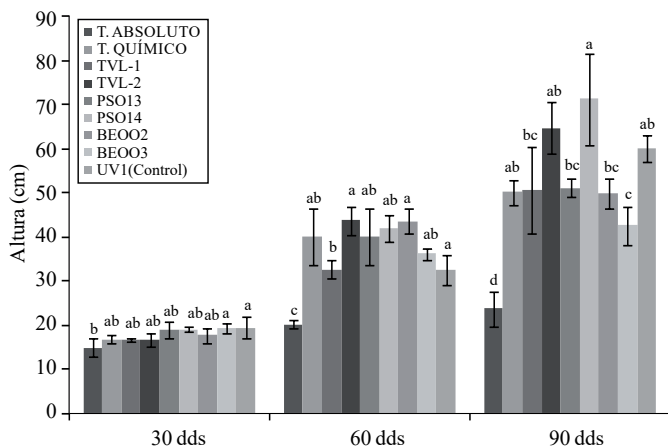
influence the growth and development of plants. Several studies have shown that *in vitro* production of IAA and other physiologically active hormone derived from L-tryptophan are a feature of PGPR strains (Peñas and Reyes, 2007; Teixeira *et al.*, 2007).

Ali *et al.* (2009) found that different isolates of *Bacillus* sp. increased the concentration of IAA produced by increasing the concentration of L-tryptophan in the culture medium results in ranges ranging between  $19.6 \pm 0.7$  mg/mL and  $21 \pm 0.6$  mg/mL. Importantly, in this experiment were used low concentrations of tryptophan (100 mg/L) to evaluate



cepas BPCV (Peñas y Reyes, 2007; Teixeira *et al.*, 2007). Ali *et al.* (2009) encontraron que diferentes aislamientos de *Bacillus* sp. aumentaron la concentración de AIA producido al aumentar la concentración de L-triptófano en el medio de cultivo con resultados que oscilaban en rangos entre  $19.6 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $21 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Es importante resaltar que en el presente ensayo se utilizaron concentraciones bajas de triptófano (100 mg/L) para evaluar la producción de indoles, lo cual permite afirmar que las cepas evaluadas pueden ser consideradas como promotoras del crecimiento vegetal por su alta síntesis de este tipo de compuestos con valores que oscilan entre 18 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Experimento en invernadero. Longitud de la planta.** Los resultados en altura de la planta mostraron incrementos en el tamaño de la planta hasta dos veces en los tratamientos con *Enterobacter* sp. TVL-2 y *Bacillus* sp. BEOO2 en el segundo mes de muestreo. En el tercer mes, la bacteria que mostró ejercer el mayor efecto fue *P. putida* PSO14 la cual fue casi tres veces mayor con respecto al testigo absoluto, mientras que comparado con el testigo químico presentó una diferencia de 30% (Figura 1).



**Figura 1. Altura de las plantas de tomate (variedad Sofía). Dds= días después de la siembra. Cada valor es la media de tres repeticiones.** Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

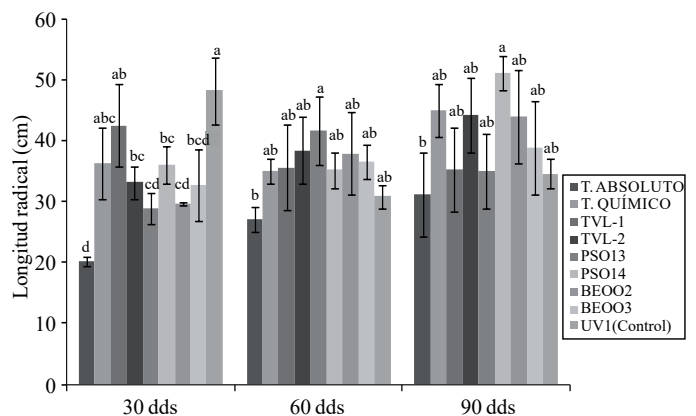
**Figure 1. Height of tomato plants (variety Sofia). Dap= days after planting. Each value is the mean of three replications.** The error bars represent the standard deviation. The letters represent statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

La longitud radical fue incrementada por la inoculación bacteriana. En el primer mes se observan diferencias importantes ejercidas por la cepa *E. agglomerans* UV1 y *Enterobacter* sp. TVL-1 de casi dos veces con respecto al

the production of indoles, which can be said that, the strains tested can be considered as promoters of plant growth by high synthesis of this type compounds with values ranging between 18 and 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Greenhouse experiment. Length of the plant.** The results in plant height showed increases in the size of the plant up to twice in treatments with *Enterobacter* sp. TVL-2 and *Bacillus* sp. BEOO2 in the second month of sampling. In the third month, the bacteria that showed exercise the greatest effect was *P. putida* PSO14 which was almost three times higher compared to the untreated control, while compared with the chemical control showed a difference of 30% (Figure 1).

The root length was increased by bacterial inoculation. In the first month there were significant differences exerted by the strain *E. agglomerans* UV1 and *Enterobacter* sp. TVL-1 nearly two times compared to the untreated control in the second month showed that the strain *P. fluorescens* PSO13 exceeded 16% to chemical control, and the third month of sampling, significant differences with respect to absolute control by the strain *P. putida* PSO14 (Figure 2).



**Figura 2. Longitud radical de la planta de tomate (variedad Sofía). Dds= días después de la siembra. Cada valor es la media de tres repeticiones.** Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 2. Radical length of the tomato plant (variety Sofia). Dap= days after planting. Each value is the mean of three replications.** The error bars represent the standard deviation. The letters represent statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

The strain *P. putida* PSO14 was the most significant influence on the elongation process of the tomato plants, which could be related to the ability to produce beneficial metabolites such

testigo absoluto En el segundo mes se observó que la cepa *P. fluorescens* PSO13 superó 16% al testigo químico y al tercer mes de muestreo, se encontraron diferencias significativas con respecto al testigo absoluto por parte de la cepa *P. putida* PSO14 (Figura 2).

La cepa *P. putida* PSO14 fue la que más influyó sobre el proceso de elongación de las plantas de tomate, lo cual pudo estar relacionado con la capacidad de producir metabolitos benéficos, tales como fitohormonas y sideróforos o a la solubilización de fósforo inorgánico aumentando su disponibilidad para la planta. Se debe destacar que a pesar que *P. putida* PSO14 no mostró los mejores resultados *in vitro* si evidenció el mejor efecto sobre la planta en las dos variables de longitud, estos resultados pueden ser explicados con base en la presencia de diferentes condiciones entre las pruebas realizadas en invernadero y laboratorio, las cuales pueden influir significativamente sobre la capacidad de las bacterias para promover el crecimiento vegetal. Resultados similares han sido reportados por Kirankumar *et al.* (2008) y Kumar *et al.* (2010) quienes evidenciaron que el género *Pseudomonas* mejoró significativamente el crecimiento vegetal de plantas de tomate registrando mayor altura, mayor rendimiento del fruto y absorción de nutrientes.

### Peso seco de la planta

En el tercer mes la cepa *Enterobacter* sp. TVL-2 presentó un efecto importante en la biomasa aérea puesto que se mantuvo igual al tratamiento químico y presentó un valor significativamente mayor que el del testigo absoluto (Figura 3).

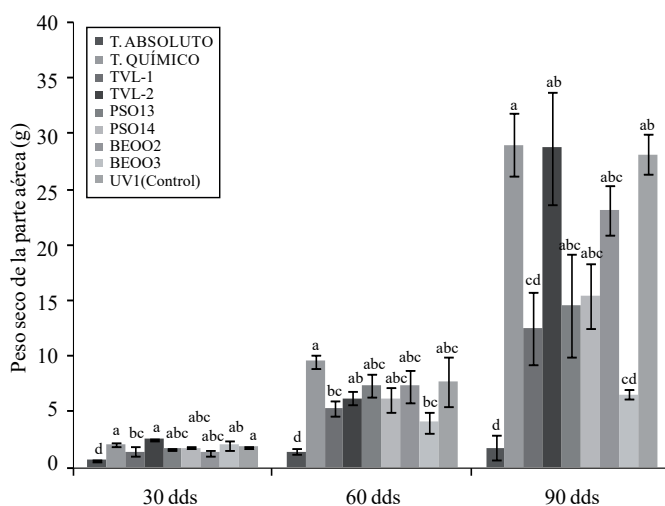
En cuanto a la biomasa radical las cepas *Enterobacter* sp. TVL-2 y *P. putida* PSO14 mostraron los mejores resultados superando al testigo químico por 23% y 10%, y presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al control absoluto (Figura 4).

El aumento de la biomasa radical tiene fuertes repercusiones en la capacidad de las plantas para asimilar los nutrientes del suelo puesto que representa una mayor exploración del suelo por parte de éstas (Antoun y Prevost, 2005). Varios estudios han mostrado que el ácido 3-indolacético (AIA) tiene un importante impacto sobre el desarrollo radicular de las plantas (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Patten y Glick (2002) aseguraron que el género de *Pseudomonas* sp., tiene potencial para estimular el crecimiento de las plantas por la producción de AIA; lo cual se observó en el presente

as fitohormones and siderophores or inorganic phosphorus solubilizing increasing their availability to the plant. It should be noted that, even though *P. putida* PSO14 did not show the best results *in vitro*, it did showed the best effect if on the ground in the two variables of length, these results can be explained based on the presence of different testing conditions between the greenhouse and laboratory, which may influence significantly on the ability of bacteria to promote plant growth. Similar results have been reported by Kirankumar *et al.* (2008) and Kumar *et al.* (2010) who showed that, the genus *Pseudomonas* significantly improved plant growth of tomato plants recorded higher height, higher fruit yield and nutrient uptake.

### Plant dry weight

In the third month the strain *Enterobacter* sp. TVL-2 had a significant effect on aboveground biomass remained unchanged since the chemical treatment and showed a significantly higher than the untreated control (Figure 3).

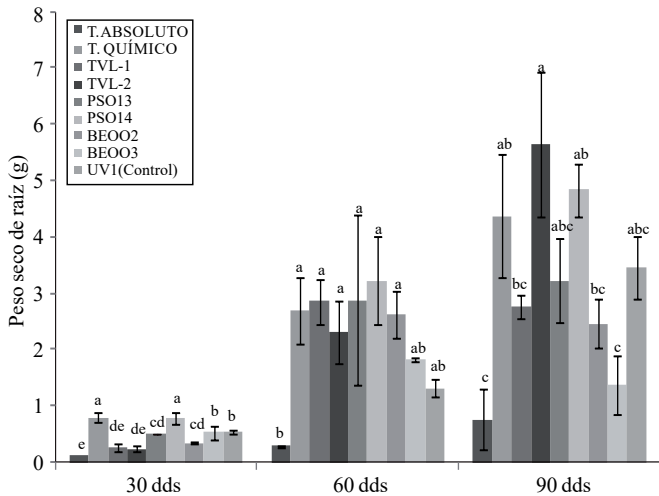


**Figura 3. Peso seco de la parte aérea de planta de tomate (variedad Sofia). Dds= días después de la siembra. Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).**

**Figure 3. Dry weight of the tomato plant area (variety Sofia). Dap= days after planting. Each value is the mean of 3 replicates. The error bars represent the standard deviation. The letters represent statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).**

Regarding the root biomass, the strains *Enterobacter* sp. TVL-2 and *P. putida* PSO14 showed the best chemical control surpassing by 23% and 10%, and statistically significantly different compared to the absolute control (Figure 4).

estudio. De igual manera, Gravel *et al.* (2006) mostraron que la cepa de *P. putida* subgrupo B1 es capaz de sintetizar AIA a partir de diferentes precursores, encontrando además un incremento en el peso seco de la raíz y en la producción de frutos de plantas de maíz.



**Figura 4. Peso seco de raíz de planta de tomate (variedad Sofía). Dds= días después de la siembra. Cada valor es la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ).**

**Figure 4. Root dry weight of tomato plant (variety Sofia). Dap= days after planting. Each value is the mean of three replications. The error bars represent the standard deviation. The letters represent statistical differences ( $p \leq 0.05$ ).**

**Número de flores y frutos**

Todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de flores a los 90 dds con respecto al control absoluto. La inoculación con la cepa *Enterobacter* sp. TVL-2 exhibió los mejores resultados con un valor promedio de nueve flores por planta, en relación a una flor del testigo absoluto y 4 del testigo químico (Figura 5).

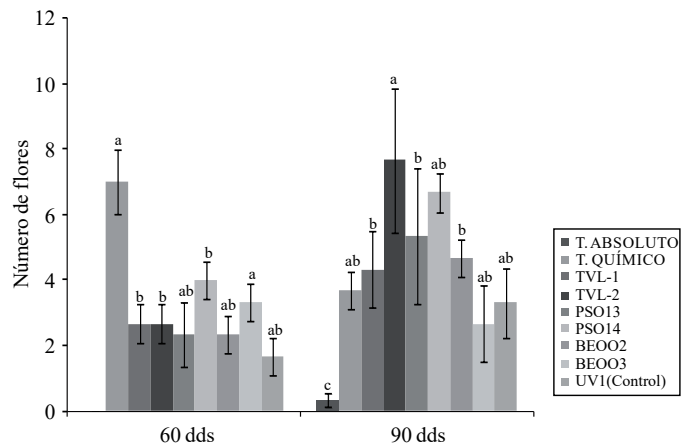
En el número de frutos los resultados también se evidenciaron al tercer mes, en el cual las cepas *Enterobacter* sp. TVL-2 y *P. putida* PSO14 superaron 29% y 17% al testigo químico y al testigo absoluto con una producción de 6 frutos por planta en relación a 1 (Figura 6).

La producción de auxinas también se encuentra íntimamente relacionada con los procesos de fructificación de las plantas (Srivastava y Handa, 2005). Por tanto, se puede inferir que

The increase in root biomass has strong impact on the ability of plants to absorb nutrients from the soil since it represents a further exploration of the land (Antoun and Prevost, 2005). Several studies have shown that 3-indoleacetic acid (IAA) has a major impact on root development of plants (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Patten and Glick (2002) claimed that, the genus *Pseudomonas* sp., has the potential to stimulate plant growth by production of IAA, which was observed in this paper. Likewise, Gravel *et al.* (2006) showed that, the strain *P. putida* subgrupo B1 is able to synthesize IAA from different precursors, also finding an increase in root dry weight and fruit production of maize plants.

**Number of flowers and fruits**

All the treatments showed statistically significant differences in the number of flowers at 90 dap compared to absolute control. The inoculation with strain *Enterobacter* sp. TVL-2 exhibited the best results with an average of nine flowers per plant, compared to a flower of the absolute control of chemical control and 4 (Figure 5).



**Figura 5. Número de flores (variedad Sofía). Dds = días después de la siembra. Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).**

**Figure 5. Number of flowers (variety Sofia). Dap= days after planting. Each value is the mean of 3 replicates. The error bars represent the standard deviation. The letters represent statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).**

In the number of fruits the results also showed at the third month, in which the strains *Enterobacter* sp. TVL-2 and *P. putida* PSO14 exceeded 29% and 17% to chemical control and the absolute control with an output of 6 fruits per plant in relation to 1 (Figure 6).

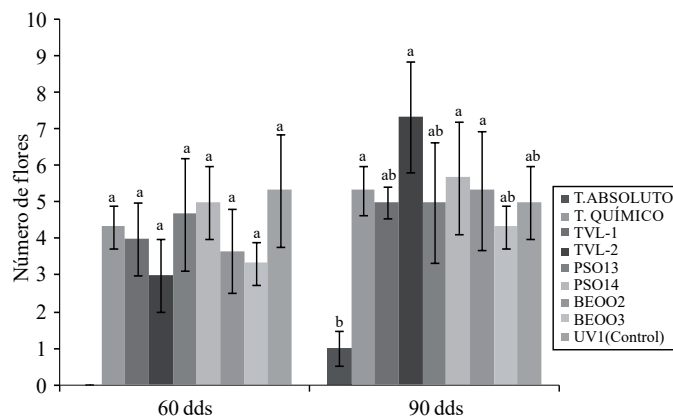
la inoculación con las bacterias favoreció la producción de frutos, teniendo en cuenta que las cepas evaluadas presentaron producción de índoles. Con relación a los resultados obtenidos en el presente estudio se debe mencionar que otros autores (Badri *et al.*, 2009) han reportado la capacidad productora de índoles, sideróforos y solubilización de fósforo como mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas (Ma *et al.*, 2011). Otros autores han reportado el efecto de cepas de *P. marginalis* y *P. putida* sobre la producción de tomate bajo condiciones de invernadero, aumentando el número de frutos 11 y 23.3% (Gravel *et al.*, 2007). De forma adicional se ha encontrado que *P. fluorescens* incrementa ésta producción hasta 13.35% (Gagné *et al.*, 1993), *B. subtilis*, 25% (Mena y Olalde, 2007) y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en 17.77% (Luna *et al.*, 2011); resultados que soportan lo encontrado en el presente estudio.

De forma adicional se debe señalar que el sustrato empleado en el ensayo fue suelo, este pudo contener importantes concentraciones de compuestos fosfatados orgánicos e inorgánicos no disponibles, que gracias a la acción bacteriana hayan podido volverse disponibles para las plantas. En ese sentido, Hariprasad *et al.* (2009) evaluaron cepas de *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* y *Enterobacter* sp., que no sólo presentaron la capacidad de sintetizar AIA, sino que además presentaron solubilización de fósforo *in vitro*, encontrando un efecto positivo sobre el desarrollo de plantas de tomate en cuanto a su longitud radical, altura, producción de biomasa y adquisición de fósforo, cuando estas cepas fueron inoculadas.

Se debe resaltar la dosis de fertilización empleada en aquellos tratamientos que fueron inoculados con las diferentes cepas evaluadas, la cual correspondió a 50% de la fertilización total que recibió el testigo químico. Con relación a lo anterior se puede observar en todas las variables agronómicas evaluadas que los tratamientos inoculados que presentaron los mejores resultados siempre superaron o igualaron al testigo químico, lo cual fortalece la importancia de este tipo de inoculantes como complemento de la fertilización de síntesis que permita mitigar su uso en exceso.

## Conclusiones

De forma preliminar se puede establecer que la inoculación de las plantas de tomate con las cepas *Enterobacter* sp. TVL-2 y *P. putida* PSO14 exhibe un gran potencial



**Figura 6. Número de frutos (variedad Sofia). Dds= días después de la siembra. Cada valor es la media de 3 repeticiones.** Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 6. Number of fruits (variety Sofia). Dap= days after planting. Each value is the mean of 3 replicates.** The error bars represent the standard deviation. The letters represent statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

The production of auxin is also closely related to the processes of fruiting plants (Srivastava and Handa, 2005). Therefore, it can be inferred that inoculation with bacteria favored the production of fruits, given that the strains tested present production of índoles. Regarding the results obtained in this study should be mentioned that other authors (Badri *et al.*, 2009) have reported production capacity of índoles, siderophores and solubilization of phosphorus as mechanisms to promote the growth of plants (Ma *et al.*, 2011). Other authors have reported the effect of strains of *P. marginalis* and *P. putida* on tomato production under greenhouse conditions, increasing the number of nuts 11 and 23.3% (Gravel *et al.*, 2007). Additionally it has been found that *P. fluorescens* increase this production to 13.35% (Gagné *et al.*, 1993), *B. subtilis*, 25% (Mena and Olalde, 2007) and *Gluconacetobacter diazotrophicus* in 17.77% (Luna *et al.*, 2011), results that support the findings in this study.

Furthermore, it should be noted that the substrate was used in the test soil, this could contain significant concentrations of organic and inorganic phosphate compounds not available, due to bacterial action may have become available to plants. In that sense, Hariprasad *et al.* (2009) evaluated strains of *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* and *Enterobacter* sp., which did not only showed the ability to synthesize IAA, but also of phosphorus solubilizing presented *in vitro* and found a positive effect on the

para estimular el crecimiento y la producción de este cultivo. El uso de este tipo de bacterias, pueden ser una alternativa prometedoras como biofertilizantes para el cultivo de tomate y la producción en la agricultura sostenible teniendo en cuenta que disminuiría el impacto sobre el medio ambiente al reducir el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química. De igual forma, se podrán reducir los costos de producción al requerirse la mitad de la dosis de fertilizante químico, que al ser suplementado con la fertilización bacteriana permite obtener los mismos resultados. Por tanto, la inoculación con estos microorganismos promotores de crecimiento vegetal representa una alternativa limpia y segura para asegurar la fertilización de los cultivos sin incurrir en los costos ambientales y económicos de la fertilización química tradicional.

## Literatura citada

- Ali, B.; Sabri, A.; Ljung, K. and Hasnain, S. 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25(3):519-526.
- Alikhani, H.; Saleh-Rastin, N. and Antoun, H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant Soil.* 287:35-14.
- Antoun, H. and Prevost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *In: Siddiqui, Z. A. (Ed.). PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* Springer. 1-38 pp.
- Ashrafuzzaman, M.; Islam, M.; Ismail, M.; Shahidullah, S. and Hanafi, M. 2009. Evaluation of six aromatic rice varieties for yield and yield contributing characters. *Int. J. Agric. Biol.* 11:616-620.
- Badri, D.; Weir, T.; van der Lelie, D. and Vivanco, J. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:642-650.
- Chen, Y.; Rekha, P.; Arun, F.; Schen, W.; Lai, C. and Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34:33-41.
- Fernández, M. 2007. Sobre los de la caña de azúcar. *Red de Revistas Científicas de América Latina. CIDCA. El Caribe, Portugal.* 41(2):51-57.
- development of tomato plants in their root length, height, production biomass and phosphorus acquisition, when these strains were inoculated.
- It must be emphasized the fertilization rate employed in those treatments which were inoculated with different strains, corresponding to 50% of the total fertilization received the chemical control. Regarding the above, we can be observed in all agronomic variables that inoculated treatments showed the best results always exceeded or equaled the chemical control, which reinforces the importance of this type of inoculants to complement synthetic fertilization that allows mitigate its overuse.

## Conclusions

In a preliminary statement, it can be established that inoculation of tomato plants with the strains *Enterobacter* sp. TVL-2 and *P. putida* PSO14 exhibits a great potential for growth and production of this crop. Using this type of bacteria, may be a promising alternative as biofertilizers for growing tomatoes and sustainable agriculture production considering that, it reduces the impact on the environment by reducing the excessive use of synthetic chemical fertilizers. Likewise, it may even reduce the production costs by requiring half the dose of chemical fertilizer, which when supplemented with bacterial fertilization allows to obtaining the same results. Thus, inoculation with these microorganisms in plant growth promoters represents a clean, safe alternative to ensure the fertilization of crops without incurring the environmental and economic costs of traditional chemical fertilization.

*End of the English version*



- Fiske, C. and subbaRow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375.
- Gupta, N.; Sabat, J.; Parida, R. and Kerkatta, D. 2007. Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Botánica.* 66(2):197-204.

- Gagné, S.; Dehbi, L.; Le Queré, D.; Cayer, F.; Morin, J.; Lemay, R. and Fournier, N. 1993. Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat-based growing media. *Soil Biol. Biochem.* 25(2):269-272.
- Glickman, E. and Dessaux, Y. 1995. A Critical examination of the specificity of the salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2):793-796.
- Gravel, V.; Martínez, C.; Antoun, H. and Tweddell, R. 2006. Control of greenhouse tomato root rot (*Pythium ultimum*) in hydroponic systems. using plant-growth-promoting microorganisms. *J. Plant Pathol.* 28:475-483.
- Gravel, V; Antoun, H and 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 Biol. Biochem.* 39:1968-1977.
- Gunnarsson, N.; Mortensen, U.; Sosio, M.; Nielsen, J. 2004. Identification of the enter- doudoroff pathway in an antibiotic-producing actinomycetes species. *Mol. Microbiol.* 2(3):895-92.
- Hariprasad, P.; Navya, H.; Chandra, S. and Niranjana, S. 2009. Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biological Control.* 50:307-316.
- Jaramillo, N.; Rodríguez, P.; Guzmán, A. y Zapata, C. 2007. Manual técnico buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Corpoica. Ed. CTP Print Ltda. 314 p.
- Kang, S.; Hat, C.; Lee, T. and Maheshwari, D. 2002. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. *Curr. Sci.* 82:439-442.
- Kirankumar, R.; Jagadeesh, K.; Krishnaraj, P. and Patil, M. 2008. Enhanced growth promotion of tomato and nutrient uptake by plant growth promoting rhizobacterial isolates in presence of tobacco mosaic virus pathogen. *Karnataka J. Agric. Sci.* 21:309-311.
- Kumar-Mishra, R.; Prakash, O.; Alam, M. and Dikshit, A. 2010. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. *Herit. Recent Res. Sci. Technol.* 2(5):53-57.
- Luna, M.; Aprea, J.; Crespo, J. and Boiardi, J. 2011. Colonization and yield promotion of tomato by gluconacetobacter diazotrophicus. *Appl. Soil Ecol.* doi:10.1016/j.apsoil.2011.09.002.
- Ma, Y.; Prasad, M.; Rajkumar, M. and Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Advances.* 29:248-258.
- Mejía, M.; Estrada, E. y Franco, M. 2007. Respuesta del tomate chonto cultivar Unapal Maravilla, a diferentes concentraciones de nutrientes. *Acta Agronómica.* 56(2):75-83.
- Mena, H. and Olalde, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Sci. Hortic.* 113:103-106.
- Park, J.; Bolanab, N.; Mallavarapuab, M. and Naiduab, R. 2010. Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria. *World Congress of Soil Science. Soil Solutions for a Changing World Brisbane.* Published on DVD. 66:1-6.
- Patten, C. and Glick, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3795-3801.
- Pérez, M. y Smyth, T. 2005. Potencial agronómico y eficiencia agronómica de tres rocas fosfóricas de diferente composición mineralógica. *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia. Venezuela.* 22:214-227.
- Rodríguez, H and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Advances.* 17:319-339.
- Rodríguez, H; González, T; Goire, I and Bashan, Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften.* 91:552-555.
- Schwyn, B. and Neilands, J. 1987. Universal chemical assays for the detection and determination of siderophores. *Analy. Biochem.* 160:47-56.
- Seshadri, S; Ignacimuthu, S. and Lakshminarsimhan, C. 2002. Variation of heterotrophic and phosphate solubilizing bacteria from Chennai. *Southeast coast of India. Indian J. Marine Sci.* 31:69-72.

- Sharma, V; Archana, G. y Kumar, G. 2011. Plasmid load adversely affects growth and gluconic acid secretion ability of mineral phosphate solubilizing rhizospheric bacterium *Enterobacter asburiae* PSI3 under P limited conditions. *Microbiol. Res.* 166:36-46.
- Srivastava, A. and Handa, A. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *J. Plant Growth Regulation.* 24:6-82.
- Tabatabai, M. and Bremner. M. 1969. Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1:301-307.
- Yu, X.; Liu, X.; Zhu, T.; Liu, H. and Mao, C. 2011. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol. Fertility Soils.* 47:43-446.
- Vassilev, N.; Toro, M.; Vassileva, M.; Azcon, R. and Barea, J. M. 1997. Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Bio. Technol.* 61(1):29-32.
- Vassilev, N.; Medina, A. and Vassileva, M. 2006. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant Soil.* 287:77-84.