

La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares

Plant inoculation with *Pantoea* sp., phosphate solubilising-bacteria increases P concentration in leaf tissues

Jorge Cordero Elvia*¹, Patricia Ortega-Rodés², Eduardo Ortega³

Resumen

El fósforo (P) es un macronutriente mineral esencial para las plantas. Aunque puede encontrarse en los suelos en diferentes formas minerales, la baja solubilidad de estos disminuye su disponibilidad para las plantas, y el nutriente debe aplicarse como fertilizante a los cultivos. Las reservas mundiales de P son limitadas y tendrán una reducción considerable en los próximos años. Usar microorganismos solubilizadores de fosfatos como inoculante para los cultivos es una alternativa biotecnológica para incrementar la disponibilidad del nutriente. *Pantoea* sp. (cepa 9C) es una bacteria endofítica fijadora de nitrógeno, aislada del interior de tallos de la caña de azúcar (Loiret et ál., 2004); este microorganismo produjo halos de solubilización con tamaños de hasta 6 mm en medio sólido NBRI-P en 7 días a 30 °C, y en ese tiempo y condiciones solubilizó $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en el medio líquido hasta acumular $1128 \mu\text{g P mL}^{-1}$. La bacteria sobrevivió durante 35 días en un sustrato preparado con mezcla de Vermiculita y suelo ferralítico rojo (Cambisol Ferrálico, ródico), alcanzando poblaciones de $3,2 \times 10^{15}$ células g^{-1} . Plantas de rábano (*Raphanus sativus*, L. var. Scarlet Globe), de alta demanda de P y crecimiento rápido, usadas como modelo y cultivadas en suelos inoculados con el microorganismo, absorbieron más P que las plantas no inoculadas, alcanzando en los tejidos foliares concentraciones ≥ 3500 ppm P_{base seca}.

Palabras clave: bacteria endofítica, solubilización de fosfatos, rábano (*Raphanus sativus*, L.), caña de azúcar (*Saccharum* híbrido).

Abstract

Phosphorus is an essential mineral macronutrient for plant growth and development. Although it can be found in soils in different mineral forms, its low solubility decrease its availability for plants; the nutrient should be added to crops as fertiliser. World sources of P are limited and in the near future they will suffer a remarkable decrease. Using P solubiliser microorganisms as inoculants for crops is a biotechnological alternative to increasing its availability. *Pantoea* sp. (9C strain) is an endophytic nitrogen-fixing

* Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

1 Lic. en Biología.

2 MSc. en Biología Vegetal.

3 Dr. en Ciencias Biológicas. Profesor titular. eortega@fa.uh.cu

bacterium isolated from the inside of sugarcane stems (Loiret et ál., 2004). The microorganism is able to produce 6 mm solubilisation halo in plate assays after 7 days at 30°C, and also solubilise $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in NBRI-P liquid medium, producing values of 1,128 $\mu\text{g P mL}^{-1}$. It is also able to survive for at least 35 days in a substrate mixture prepared with Vermiculite and Red Ferralitic (Ferralic Cambisol, rhodic) soil, producing populations of $3.2 \times 1,0^{15}$ cells g^{-1} . Fast growth and high demanding P radish plants (*Raphanus sativus*, L. var. Scarlet Globe) used as model plants cultivated in soil inoculated with the microorganism absorbed more P than the non-inoculated plants, reaching $\geq 3,500$ ppm $\text{P}_{\text{dry weight}}$ in foliar tissue.

Key words: Endophytic bacteria, phosphate solubilization, radish (*Raphanus sativus*, L.), sugarcane (*Saccharum* hybrid).

Recibido: abril 15 de 2008

Aprobado: junio 4 de 2008

Introducción

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para la vida de las plantas. Las mayores reservas en el suelo son las rocas y los depósitos como las apatitas primarias y otros minerales formados durante otras eras geológicas (Odum y Barret, 2005); se encuentran formando parte de un estrato rocoso cuya principal característica es la insolubilidad. La disponibilidad de P para las plantas está relacionada con la concentración en la solución del suelo (Magdoff et ál., 1999), y representa una fracción pequeña del total. Para lograr altos rendimientos los cultivos requieren la aplicación de fertilizantes fosfóricos, pero las reservas mundiales de este mineral se agotarán hasta en un 50% para el periodo 2040-2060 (Steen, 1998).

Algunas especies bacterianas tienen la capacidad de solubilizar compuestos insolubles de fosfatos inorgánicos como el tricálcico, y el dicálcico, la hidroxapatita y las rocas fosfatadas. Entre los géneros con esta capacidad se conocen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Goldstein, 1986). Teniendo en cuenta el efecto potencial perjudicial del mal uso de fertilizantes químicos, y las limitaciones para la adquisición de fertilizantes que tienen los países subdesarrollados, el empleo de estos microorganismos pudiera resultar beneficioso para mejorar la disponibilidad de nutrientes en los suelos.

La cepa bacteriana 9C de la especie *Pantoea* sp. es un endófito aislado del interior del tallo de la caña de azúcar (Loiret et ál., 2004). Los objetivos de este trabajo fueron conocer la capacidad solubilizadora de fosfatos de la bacteria y evaluar el aporte de P a las plantas al inocularla al sustrato, utilizando rábano (*Raphanus sativus*, L. var. Scarlet Globe) como planta modelo.

Materiales y métodos

Capacidad de Pantoea sp. para solubilizar fosfatos in vitro

La capacidad solubilizadora se determinó según la metodología planteada por Nautiyal et ál. (2002). En el centro de placas Petri con medio NBRI-P (National Botanical Research Institute) sólido se inocularon 10 μL de suspensión celular de la cepa 9C de *Pantoea* sp; el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5g L^{-1}) se utilizó como fuente de fosfato poco soluble, y al medio se adicionó bromofenol azul (25 mg/ L^{-1}) como indicador de pH. La bacteria se cultivó previamente en medio LGI-P durante 48 horas a 30 °C. El cultivo se centrifugó a 5000 g por 10 min, y las células se resuspendieron con medio NBRI-P sin P hasta alcanzar 10^5 UFC mL^{-1} . Las placas se incubaron 5 días a 30 °C. Los diámetros de las colonias y del halo de solubilización (translúcido) alrededor de las mismas se midieron a las 0, 24, 48, 72, 96, 110, 182 y 248

horas. Al diámetro del halo de solubilización se le restó el de la colonia y ese valor se tomó como tamaño del halo de solubilización. Se hicieron 5 réplicas en cada medición.

La estimación cuantitativa de la solubilización de fosfato se llevó a cabo empleando la metodología planteada por Nautiyal (1999). Tubos de ensayo con 15 mL de medio NBRI-P líquido se inocularon con 0,1 mL de una suspensión celular (10^5 UFC mL⁻¹) del microorganismo, obtenida de igual forma que en el experimento anterior. Se utilizó como control el mismo medio no inoculado. Los tubos fueron mantenidos a 30 °C sin agitación durante 7 días; la concentración de P soluble y el pH en el medio de cultivo se determinó a las 0, 24, 48, 72, 120 y 170 h, se hicieron 3 réplicas para cada tiempo. Para determinar la concentración de P soluble se centrifugó el contenido de los tubos de cultivo a 5000 g por 10 min y se tomó 0,1 mL del sobrenadante. El resto del sobrenadante se utilizó para medir el pH de la solución con un pH metro.

Todas las determinaciones de P en este trabajo se hicieron por colorimetría según el método del sulfomolibdico (Jackson, 1958).

Capacidad de supervivencia de *Pantoea* sp. en el suelo

Se tomó tierra de la capa arable de un suelo ferralítico rojo (Cambisol Ferrálico, ródico) procedente de la provincia Habana. El suelo fue desmenuzado, secado al aire y homogeneizado; las piedras y restos de plantas fueron eliminadas. Se preparó un sustrato mezclando la tierra procesada con vermiculita en una proporción 1:2 (v:v). La mezcla fue pasada por tamiz de 2 mm de poro, homogeneizada y esterilizada en autoclave durante 20 min a 137 kPa y 124 °C. En tubos plásticos estériles de 15 mL se añadieron 4,2 g del sustrato preparado; a cada tubo se añadieron 600 µL de una suspensión celular del microorganismo (*Pantoea* sp., cepa 9C) en NaCl 0,9% que contenía $3,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹; se hicieron tres réplicas. Los tubos fueron mantenidos durante el experimento en incubadora

a 30 °C y se dejaron tapados a media rosca para garantizar condiciones de crecimiento aerobias. Agua líquida en un recipiente dentro de la incubadora ayudó a mantener una alta humedad relativa y evitar la pérdida de agua del suelo por evaporación.

Se determinó el crecimiento de la bacteria en el suelo a los 5, 8, 14, 16, 31 y 35 días. Los microorganismos se recuperaron añadiendo 5 mL de solución de NaCl 0,9% a cada tubo y homogeneizando en vortex 5 min. Luego se centrifugó a 50 g durante 1 min para precipitar el suelo pero no las células bacterianas. Para cuantificar las bacterias que pasaron a la solución salina se tomaron alícuotas, se sembraron en placas con Agar nutriente (Biocen No. cat 4009), y se realizó el conteo de viables. Los valores fueron expresados como UFC g⁻¹ sustrato.

Movilización de fósforo del sustrato por *Pantoea* sp. y disponibilidad para las plantas

El rábano (*Raphanus sativus* L., var Early Scarlet Globe) fue empleado como planta modelo porque presenta un crecimiento rápido, es genéticamente homogéneo, produce cosechas en un tiempo corto, y realiza una gran absorción de P del suelo (Hewitson y Price, 1994). Las plantas fueron cultivadas en potes de 0,5 L a los cuales se les añadió sustrato con características similares a las descritas en el experimento anterior; con la diferencia de que el sustrato fue suplementado con sulfato de amonio y cloruro de potasio en cantidades equivalentes a 100 kg N ha⁻¹ y 100 kg K₂O ha⁻¹. Se emplearon 4 tratamientos con 5 réplicas cada uno (tabla 1). Paralelamente se aplicaron estos mismos tratamientos pero en potes sin plantas.

El experimento se realizó en condiciones de casa con techo de cristal. La cantidad de fosfato tricálcico empleada en los tratamientos +P equivale a 100 kg P ha⁻¹, y ésta se homogeneizó manualmente con el suelo. Se sembraron cuatro semillas por pote y a los 10 días de cultivo se dejaron 2 plantas tratando de garantizar homogeneidad entre ellas. La inoculación del

Tabla 1. Tratamientos empleados para el cultivo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L. var Early Scarlet Globe).

Tratamiento	(Ca ₃ (PO ₄) ₂)	<i>Pantoea</i> sp. (9C)
+P+9C	+	+
+P-9C	+	-
-P+9C	-	+
-P-9C	-	-

(+)Presencia (-)Ausencia

suelo se realizó a los 18 días de cultivo; en un experimento previo (datos no mostrados) se determinó que en este momento las raíces muestran un desarrollo adecuado para su posible asociación con la bacteria. A cada pote se le inoculó 1 mL de suspensión celular del microorganismo objeto de estudio en NaCl 0,9% con $3,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. El riego se realizó en días alternos a los tratamientos que contenían plantas, y cada dos días a los no sembrados; las plantas se mantuvieron bien abastecidas con agua. A cada pote se le colocó debajo una sección de placa Petri para evitar la eliminación de los microorganismos y la lixiviación de nutrientes.

La concentración de P se determinó en las hojas de las plantas cosechadas a los 42 días después de la siembra, para ello el tejido foliar fue incinerado y se le aplicó la metodología de Amaral (1972), la cual consiste en fundir las cenizas con carbonato de sodio anhidro a 900 °C por 30 min, disolver la masa con agua destilada en un volumen conocido, y en la solución resultante realizar la determinación colorimétrica de P. Las hojas de las dos plantas cultivadas en cada maceta fueron tratadas como una muestra única. Los resultados fueron expresados en base seca.

La concentración de P disponible en el suelo se determinó a los 42 días después de la siembra, según el método planteado por Oniani (1964), el cual consiste en una extracción por agitación con solución 0,05M H₂SO₄ durante 3 min. Para las determinaciones se tomaron 3 muestras del sustrato de cada pote. Los valo-

res fueron expresados en ppm P en el sustrato seco al aire.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa Statistica ® 2001 (versión 6.0). Se utilizó un diseño completamente aleatorio en todos los experimentos. Se comprobó si los datos cumplían con la normalidad y homogeneidad de varianza. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un Anova de clasificación simple (donde hubo homogeneidad de varianza), o una prueba de Kruskal Wallis (donde no hubo homogeneidad de varianza). Se realizó una comparación múltiple de medias mediante la prueba SNK cuando fue necesario. Se realizó un análisis de varianza factorial con los valores de P disponible en el suelo para determinar interacciones entre los factores: presencia de microorganismo, presencia de la planta y aplicación de fosfato tricálcico. Las pruebas estadísticas convencionales se realizaron con Microsoft Office Excel ® 2003.

Resultados

*Capacidad solubilizadora de fosfato de *Pantoea* sp. (cepa 9C)*

El cultivo de *Pantoea* sp. en medio NBRI-P sólido suplementado con el colorante bromofenol azul produjo una zona translúcida de color amarillo que se corresponde con el halo de

solubilización (figura 1). Los halos de solubilización alcanzaron un tamaño máximo de 6 mm a las 172 horas (figura 2). Luego de alcanzar el máximo, los valores se mantuvieron constantes hasta el final del experimento.

Los valores de concentración de fósforo solubilizado por *Pantoea* sp. (cepa 9C) en

medio NBRI-P líquido muestran un incremento desde cero al inicio del experimento hasta un valor de $1128 \mu\text{g P mL}^{-1}$ a las 167 horas de cultivo (figura 3). En el mismo periodo se detectó una reducción del pH desde 7 hasta 4.65.

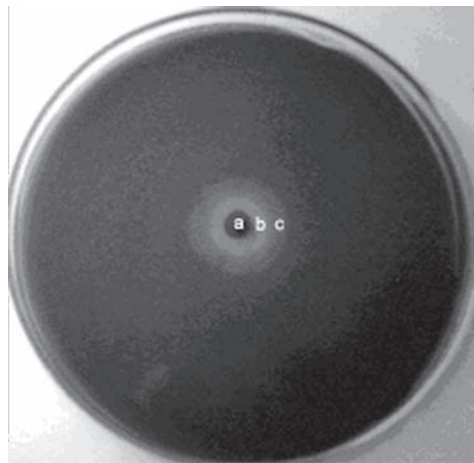


Figura 1. Colonia de *Pantoea* sp. (cepa 9C) a las 172 horas de crecimiento en medio NBRI-P sólido suplementado con bromofenol azul. (a) Colonia de la bacteria, (b) Halo de solubilización (amarillo-translúcido), y (c) Halo de acidificación (amarillo-opaco).

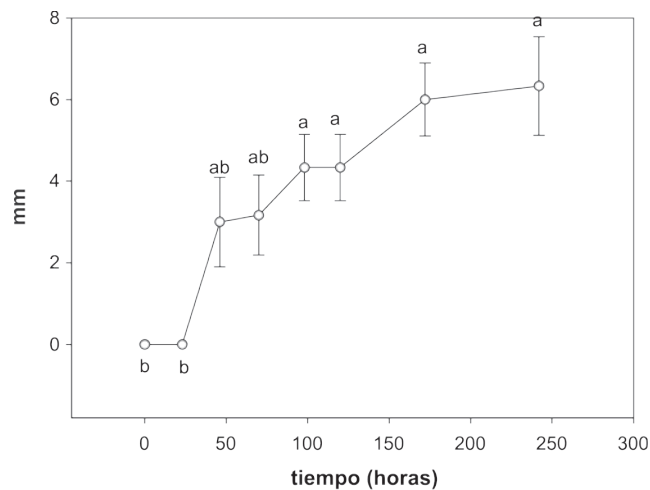


Figura 2. Tamaño de los halos de solubilización producidos en diferentes momentos del crecimiento de colonias de *Pantoea* sp. (cepa 9C) en medio NBRI-P sólido. Letras diferentes indican diferencia significativa para $\alpha=0,05$, $n=5$.

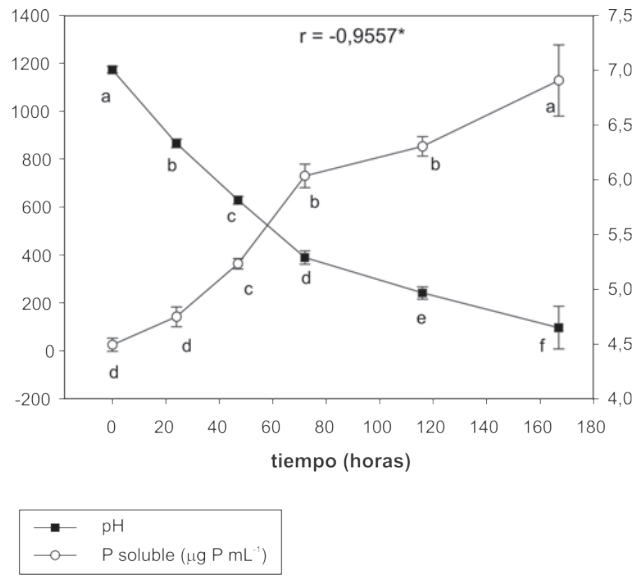


Figura 3. Concentración de fósforo solubilizado y valor del pH en el medio NBRI-P líquido, asociados al crecimiento de *Pantoea* sp. (cepa 9C) a 30 °C. Las medias de los valores de P soluble y de pH se compararon de forma independiente. Letras diferentes indican diferencia significativa para $\alpha = 0,05$, $n = 3$. Se presenta el coeficiente de correlación r entre los dos parámetros.

Capacidad de supervivencia de *Pantoea* sp. (cepa 9C) en el suelo

La población del microorganismo en el sustrato (mezcla de suelo con vermiculita) en condiciones asepticas se incrementó desde 5×10^5 UFC g^{-1} sustrato, cantidad inoculada al princi-

pio del experimento, hasta valores que se mantuvieron durante el experimento en el rango entre 10^{14} y 10^{15} UFC g^{-1} sustrato (figura 4). En la última determinación realizada a los 35 días la población de bacterias en el sustrato era de $3,3 \times 10^{14}$ UFC g^{-1} sustrato.

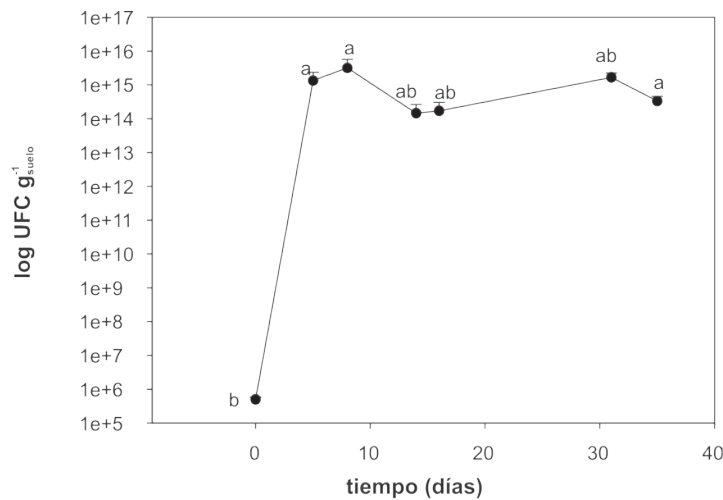


Figura 4. Crecimiento de la cepa 9C de *Pantoea* sp. en el sustrato durante 35 días a 30 °C en condiciones aerobias $n = 3$. Las barras indican la desviación estándar.

Movilización de fósforo por *Pantoea* sp. (cepa 9C), y disponibilidad para las plantas

En las plantas del tratamiento (+P+9C), cultivadas durante 42 días, el contenido de P en las hojas fue mayor que en las del resto de los tratamientos (figura 5).

Los tratamientos sin plantas no mostraron diferencias significativas en los valores de

P disponible en el suelo inoculado y sin inocular (figura 6). Al analizar los grupos de tratamientos +P+9C, +P-9C con -P+9C, -P-9C, la concentración de P disponible en el sustrato después de la cosecha fue menor en los tratamientos donde se inoculó el microorganismo (+9C) con respecto a los tratamientos no inoculados (-9C) (figura 6). Los valores fueron mayores en los tratamientos a los cuales se añadió fosfato tricálcico al suelo.

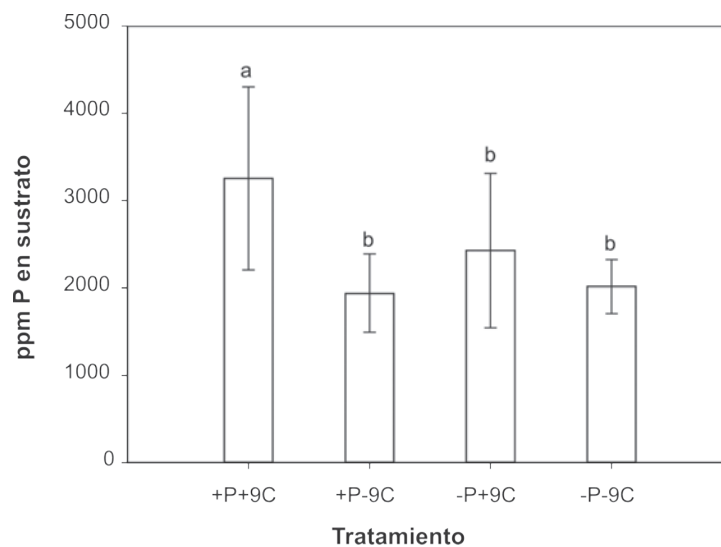


Figura 5. Concentración de fósforo en el tejido de las hojas de plantas de rábano después de 42 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas para $\alpha = 0,05$ y $n = 5$.

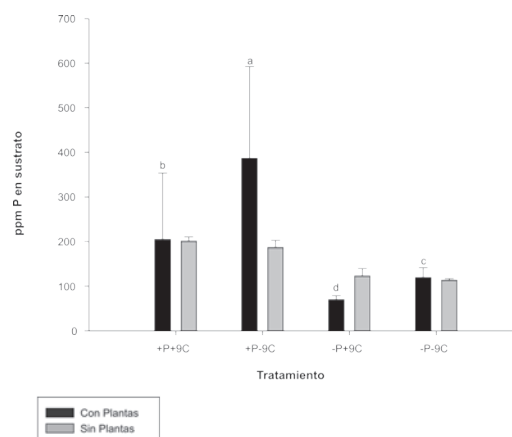


Figura 6. Concentración de fósforo disponible (ppm P base seca; método Oniani) en el sustrato después de 42 días de cultivo. Las medias de los tratamientos con plantas y sin plantas se compararon de forma independiente. Letras diferentes indican diferencias significativas para $\alpha = 0,05$, con $n = 15$ (con plantas) y $n = 3$ (sin plantas; no diferencia significativa).

Al analizar el efecto de los factores: presencia de microorganismo, presencia de la planta y aplicación de fosfato tricálcico sobre la concentración de P disponible en el suelo, se determinó que hubo interacción entre los factores presencia de planta y presencia del microorganismo ($F = 4,9763$; $p = 0,029209$).

Discusión

La solubilización de fosfato tricálcico por *Pantoea* sp. (cepa 9C) se evidenció visualmente en los cultivos en placas en medio NBRI-P (figura 1). El tamaño medio del halo de solubilización de 6 mm (figura 2) obtenido para las colonias de *Pantoea* sp. al cabo de 7 días se encuentra dentro del rango informado por Nautiyal (1999), que osciló entre 2 y 8 mm en cultivos de 14 días en cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*.

Algunos autores han encontrado resultados contradictorios entre el método de detección del halo en placas y la solubilización de fosfato en cultivos líquidos ya que muchos aislados no producen halos y son capaces de solubilizar varias fuentes de fosfato inorgánico en medio líquido (Gupta et ál., 1994; Nautiyal, 1999). La bacteria *Pantoea* sp. (cepa 9C), además de producir halos de solubilización en medio sólido, solubiliza P en cultivos líquidos a partir de un compuesto de muy baja solubilidad, alcanzándose valores de $1128 \mu\text{g P mL}^{-1}$ a las 167 horas de cultivo (figura 3). Estos valores se encuentran por encima del rango de solubilización de fosfatos ($38\text{-}510 \mu\text{g P mL}^{-1}$) en medio líquido encontrados en *Enterobacter absurdus* por Gyaneshwar et ál. (1999). También son superiores a los informados para otras especies del mismo género como *Pantoea agglomerans* (Cheng et ál., 2005; Pérez et ál., 2007; Son et ál., 2006), *Pantoea ananatis* (Pérez et ál., 2007) y *Pantoea dispersa* (Selvakumar et ál., 2007). La capacidad de solubilizar fosfatos que tiene la bacteria endofítica del género *Pantoea* estudiada, constituye una ventaja competitiva ya que la posibilidad de obtener el P puede

tener repercusión en su supervivencia en similares hábitat (Goldstein, 1995).

La disminución del pH mostró una elevada correlación con los valores de la concentración de P solubilizado ($r = -0,9557^*$), lo que indica que la acidificación en el medio de cultivo podría ser la vía por la cual ocurre el proceso de solubilización por esta bacteria. La producción de ácidos orgánicos por los microorganismos es considerada el mecanismo fundamental de la solubilización del fosfato mineral. La oxidación preplásmica directa de glucosa a ácido glucónico, y a menudo ácido 2-cetoglucónico, conforma la base metabólica de este proceso en algunas bacterias gram-negativas (Goldstein, 1995), grupo al que pertenece este microorganismo. La reducción en más de 2 unidades de pH durante 167 horas de crecimiento del microorganismo en medio NBRI-P líquido se encuentra en el rango superior de los valores de reducción de pH provocado por la acción bacteriana informados por algunos autores (Seshadri et ál., 2000; El-Komy, 2005).

Pantoea sp. (cepa 9C) es una bacteria nitrificadora que fue aislada de la savia apoplástica del tallo de la caña de azúcar; aunque no se ha informado hasta el momento su presencia en ningún otro hábitat, se conoce que es capaz de crecer en condiciones que pueden ser de estrés para otros microorganismos (Loiret et ál., 2004). Al ser cultivada a una temperatura de 30°C y en condiciones aeróbicas durante 35 días en suelo ferralítico rojo (Cambisol Ferralítico, ródico) mezclado con vermiculita, la bacteria alcanzó una población $3,3 \times 10^{14}$ UFC g^{-1} sustrato (figura 4); este es un valor considerablemente alto. Las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo pueden alcanzar valores de 10^6 UFC g^{-1} suelo (Atlas y Bartha, 1993). El incremento de la población de la bacteria inoculada al inicio del experimento hasta valores realmente altos demuestra no solo la capacidad de supervivencia de esta bacteria sino la capacidad de multiplicación en estas condiciones. El hecho de que este microorganismo pueda vivir en hábitat tan variados como pueden ser el suelo y el interior de una planta, representa

una ventaja evolutiva, ya que le brinda una mayor capacidad de respuesta ante variaciones del ambiente que pueden ser de origen abiótico o biótico, y permitiría su posible uso como biofertilizante.

El valor medio de concentración de P en las hojas de las plantas de rábano del tratamiento al cual se le añadió fosfato tricálcico y se le inoculó el microorganismo fue de 3252 ppm P en base seca (figura 5). Este valor se acerca a los valores óptimos informados para este cultivo (Sánchez et ál., 1991). En el resto de los tratamientos los valores oscilaron entre 1500 y 3000 ppm de P en base seca, los cuales están por debajo de los valores óptimos informados. Las plantas de rábano inoculadas con *Pantoea* sp. (cepa 9C) y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ añadido en el sustrato, mostraron incrementos de un 60% en el contenido de P en las hojas con respecto a plantas no inoculadas pero que tenían $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, y de un 62% con respecto a las que no contenían ni el microorganismo ni la fuente de fósforo. Los valores de P foliar encontrados son considerables y superan a los informados por El-Komy (2005), quien detectó incrementos de un 53% en el contenido de fósforo en plantas de trigo inoculadas con cepas de *Pseudomonas striata* y *Bacillus polymyxa* en comparación con las no inoculadas. También los valores son superiores a los encontrados por Reyes et ál. (2002) en plantas de maíz inoculadas con cepas de *P. rugulosum* en las cuales el contenido de P sólo se incrementó un 38% en comparación con el control. Esto demuestra que la solubilización de fosfatos que realiza *Pantoea* sp. (cepa 9C), a partir de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ añadido al suelo, aporta P para las plantas. Debe tomarse en consideración que este es un compuesto muy poco soluble con una constante del producto de solubilidad (K_{ps}) de $2,83 \times 10^{-30}$.

En los tratamientos donde crecieron plantas (figura 6, barras negras), los valores de P disponible en el suelo fueron menores (dentro de cada grupo +P o -P) cuando se inoculó el microorganismo (+9C) con respecto a los tratamientos no inoculados (-9C). Esto sugiere que cuando se efectúa la inoculación, el P so-

lubilizado por el microorganismo es absorbido por las plantas, produciendo valores menores con respecto a los tratamientos no inoculados, donde la actividad de la planta y la solubilización fisico-química son procesos que contribuirían a la movilización de este nutriente del suelo. En los tratamientos donde no había plantas sembradas (figura 6, barras grises) no existieron diferencias significativas entre el suelo inoculado y el no inoculado. Esto indica que en el proceso de absorción de fósforo donde hay inoculación existe una estrecha relación entre la planta y la bacteria.

Las plantas cultivadas con una fuente de fósforo muy poco soluble e inoculadas con *Pantoea* sp. (cepa 9C) fueron las que mostraron mayores concentraciones del elemento en las hojas (figura 5). Esto sugiere que el fosfato tricálcico en el suelo constituye una fuente de fósforo que puede ser solubilizada por la actividad microbiana y la del vegetal. En condiciones normales de crecimiento las plantas exudan gran variedad de compuestos orgánicos a través de las raíces, los cuales modifican los minerales del suelo, incrementando la disponibilidad de los nutrientes asociados a los mismos (Marchner, 1998).

Desde el punto de vista biotecnológico, la presencia de una bacteria endofítica en la caña de azúcar (*Pantoea* sp., cepa 9C) capaz no sólo de fijar nitrógeno (Loiret et ál., 2004), sino también de solubilizar fosfatos, como se demuestra en este trabajo, puede tener una potencial utilidad práctica inoculando el suelo o vitroplantas de éste u otros cultivos con la bacteria. Pensamos que si se inocula caña de azúcar con esta bacteria, la continuidad del apoplasto descrita por Dong et ál. (1997) permitiría que la misma se mueva desde los tallos hacia las raíces, salir a la rizosfera, solubilizar fosfatos y contribuir a la nutrición fosfórica de las plantas.

Conclusiones

La bacteria fijadora de nitrógeno *Pantoea* sp. (cepa 9C), endofítica de la caña de azúcar,

es también capaz de solubilizar compuestos de fósforo muy poco solubles como el fosfato tricálcico, en valores suficientemente altos, con beneficio nutrimental para las plantas de rábano (*Raphanus sativus* L., var Early Scarlet Globe), utilizadas como modelo por la alta demanda que tienen de este nutriente. Estas cualidades favorecen la idea de utilizar la bacteria en procesos biotecnológicos en los cuales la inoculación de especies cultivables de interés puede ser una alternativa al uso de fertilizantes fosfóricos, con beneficio económico y para el medioambiente, así como permitir un uso más eficiente de las reservas mundiales de fósforo, recurso no renovable.

Referencias bibliográficas

- Amaral, A. 1972. Técnicas analíticas para evaluar macronutrientes en cenizas de vainas de caña de azúcar. La Habana: Editorial Pueblo y Educación. p. 35.
- Atlas, R. M.; Bartha, R. 1993. Microbial Ecology. Redwood City, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company. p. 435.
- Chung, H.; Park, M.; Madhaiyan, M.; Seshadri, S.; Song, J.; Cho, H.; Sa, T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 1970-1974.
- Dong, Z.; McCully, M. E.; Canny, M. J. 1997. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Annals of Botany*. 80: 147-158.
- El-Komy, H. M. A. 2005. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technology and Biotechnology*. 43: 19-27.
- Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*. 1: 51-57.
- Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*. 12:185-193.
- Gupta, R.; Singal, R.; Shankar, A.; Kuhad, R. C.; Saxena R. K. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*. 40: 255-260.
- Gyaneshwar, P.; Parekh, L. J.; Archana, G.; Poole, P. S.; Collins, M. D.; Hutson, R. A.; Naresh Kumar, G. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter absuriae*. *FEMS Microbiology Letters*. 171: 223-229.
- Hewitson, J.; Richard P. 1994. Plant mineral nutrition in classroom: the radish, *Raphanus sativus* L. is a good plant for such studies. *School Science Review*. 76: 274, 45-55.
- Jackson, M. L. 1958. Soil chemical analysis. Englewood. NJ: Prentice-Hall. p. 662.
- Loiret, F. G.; Ortega, E.; Kleiner, D.; Ortega-Rodés, P.; Rodés, R.; Dong, Z. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 504-511.
- Magdoff, F. R.; Hryshko, C.; Jokela, W. E.; Durieux, R. P.; Bu, Y. 1999. Comparison of phosphorus soil test extractants for plant availability and environmental assessment. *Soil Science Society of America Journal*. 63: 999-1006
- Marschner, H. 1998. Mineral nutrition of higher plants. 2da. ed. London: Academic Press. p. 889.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 265-270.
- Nautiyal, C. S.; Chandra, S.; Mehta, S.; Pushpangadan, P. 2002. Composition for qualitative screening of phosphate solubilizing microorganisms and a qualitative method for screening microorganisms. United States Patent Application 20020172993.
- Odum, E. P.; Barret, G. W. 2005. Fundamentals of Ecology. 5ta ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. P. 624.
- Oniani, O. G. 1964. Determinación de fósforo y potasio asimilable de una misma muestra en dos tipos de suelo. *Agrojimia* (en ruso). 6: 33-45.
- Pérez, E.; Sulbarán, M.; Ball, M.; Yarzabal, L. A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 2905-2914.
- Reyes, I.; Bernier, L.; Antoun, H. 2002. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbial Ecology*. 44: 39-48.

- Sánchez, C. A.; Lockhart, M.; Porter, P. S. 1991. Response of radish to phosphorus and potassium fertilization on Histosols. *HortScience*. 26: 30-32.
- Selvakumar, G.; Kundu, S.; Joshi, P.; Nazim, S.; Gupta, A. D.; Mishra P. K.; Gupta, H. S. 2007. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-007-9558-5.
- Seshadri, S.; Muthukumarasamy, R.; Lakshminarasimhan, C.; Ignacimuthu, S. 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science*. 79: 22-27.
- Son, H.; Park, G.; Cha, M.; Heo, M. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*. 97: 204-210.
- Steen, I. 1998. Phosphorus availability in the 21st century: management of a non-renewable resource. *Phosphorus and Potassium*. 217: 25-31.