



## Isolation and screening of plant growth promoting bacteria for their application in forest species

### Aislamiento y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal para su aplicación en especies forestales

Francisco David Moreno-Valencia<sup>1</sup>, Miguel Ángel Plascencia-Espinosa<sup>1</sup>, Jesús Muñoz-Rojas<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA), Instituto Politécnico Nacional. Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, C.P. 90700. Tlaxcala, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio IC-11, Ciudad Universitaria, BUAP. San Manuel, C.P. 72570. Puebla, México.

\*Corresponding author.

E-mail address: [joymerre@hotmail.com](mailto:joymerre@hotmail.com) (J. Muñoz- Rojas).

Article history:

Received: 13 December 2017 / Received in revised form: 11 April 2018 / Accepted: 4 May 2018 / Published online: 1 July 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.3.36>

#### ABSTRACT

Isolation and screening were carried out according to their mechanism of action of endophytic and rhizospheric plant growth promoting bacteria in wild populations of *Pinus patula* and *Pinus montezumae*, Mexican conifer tree groups used for reforestation purposes due to their accelerated growth and high performance. Eighty-seven bacterial strains were isolated from pine seedlings, purified and grouped by morphological criteria. Strains producing growth phytohormones, phosphate solubilization, determination of the amount of solubilized phosphorus and chitinase production were evaluated and selected. Thirty-seven strains showed at least one of the evaluated activities, with production levels of growth phytohormones in parameters ranging from 54.4 to 139 µg/ml, halos around the colonies of 3.2 to 3.8 cm solubilizing phosphate in amounts ranging from 0.1 to 2.4 mg/L and full growth with clear zones around the colonies with halos of 1.2 to 2 cm for the production of chitinase. Results of this work represent the first step to develop a growth acceleration system for forest use plants.

**Keywords:** Mechanisms of action; plant growth promotion; reforestation; rhizospheric and endophytic bacteria.

## RESUMEN

Se realizó el aislamiento y selección según su mecanismo de acción de bacterias endofíticas y rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal de poblaciones silvestres de *Pinus patula* y *Pinus montezumae*, grupos arbóreos de coníferas mexicanas utilizados con fines de reforestación por su crecimiento acelerado y alto rendimiento. Ochenta y siete cepas bacterianas fueron aisladas de plántulas de pino, purificadas y agrupadas por criterios morfológicos. Se evaluaron y seleccionaron cepas que producen fitoreguladores de crecimiento, solubilización de fosfato, determinación de la cantidad de fósforo solubilizado y producción de quitinasa. Treinta y siete cepas mostraron al menos una de las actividades evaluadas, con niveles de producción de fitoreguladores en parámetros que van de 54.4 a 139 µg/ml, halos alrededor de las colonias de 3.2 a 3.8 cm solubilizando fosfato en cantidades que varían de 0.1 a 2.4 mg/L y crecimiento completo con zonas claras alrededor de las colonias con halos de 1.2 a 2 cm para la producción de quitinasa. Los resultados de este trabajo representan el primer paso para desarrollar un sistema de aceleración de crecimiento para plantas de uso forestal.

**Palabras clave:** Bacterias rizosféricas y endofíticas; mecanismos de acción; promoción de crecimiento vegetal; reforestación.

## 1. INTRODUCCIÓN

México presenta una tasa elevada de deforestación, con un intervalo que va de 348,000 a 534,707 hectáreas al año (Velázquez & Bocco, 2003; Rosete *et al.*, 2014). Aproximadamente, se reforesta un 30% (SEMARNAT, 2012); y de las plantas que se introducen, menos del 35% sobreviven (Maser *et al.*, 1997). Entre los factores que más inciden en los bajos valores de supervivencia se encuentran la introducción de especies exóticas, la falta de seguimiento y cuidado de las plantas después del trasplante y la ausencia de estudios que consideren factores ambientales que contribuyen al crecimiento exitoso de las plantas. Son necesarios estudios en los cuales las plantas seleccionadas se sometan a diferentes niveles de stress para evaluar la factibilidad de adaptarse y crecer a distintas condiciones.

Dentro de las prácticas que podrían favorecer la supervivencia y el crecimiento de las plantas durante el proceso de adaptación, se encuentra la aplicación de tecnología microbiana para la contribución del crecimiento de la planta y garantizar su supervivencia al trasplante. Se han desarrollado inóculos a base de bacterias que presentaron mecanismos de acción directos o indirectos aplicados principalmente a cultivos, convirtiéndose en una herramienta biotecnológica viable que no tiene efectos adversos al medio ambiente. Además, estas bacterias al ser utilizadas en la regeneración artificial de bosques, incrementan el desarrollo de plántulas inoculadas en vivero que llevan en la rizosfera altas poblaciones microbianas benéficas. De esta forma, la planta actúa como vehículo para

introducir poblaciones microbianas al suelo, que promueven el crecimiento temprano de las mismas y mitigan el stress al trasplante (Orozco-Jaramillo & Martínez-Nieto, 2009).

### ***1.1. Especies forestales seleccionadas para pruebas***

Para este trabajo, se seleccionaron las especies forestales, *P. patula* y *P. montezumae*, debido a su importancia en los paquetes tecnológicos que la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) y las diferentes dependencias encargadas de la labor de reforestación. Además de los atributos que la dependencia le da a estas especies para reforestación, restauración y conservación de suelos, se les conceden otras cualidades ecológicas que las hacen inmejorables para pruebas en viveros. *P. patula*, por su potencial productivo y capacidad para adaptarse a diferentes condiciones climáticas y suelos no forestales, es ampliamente utilizado para la producción de madera de aserrío y de material celulósico (Fierros *et al.*, 1999). *P. montezumae* se ha utilizado con éxito en varios programas de reforestación, para la protección de cuencas hidrográficas y restauración de suelos degradados (Niembro, 1986).

Con este trabajo, se propone dar el primer paso para desarrollar un Sistema de Aceleración de Crecimiento para Plantas de uso Forestal. Una vez probado su efecto en plántulas sembradas en invernadero, se pretende incrementar las poblaciones de microorganismos promotores de crecimiento vegetal por medio de las bacterias aisladas y analizadas bajo protocolos establecidos según su mecanismo de acción. El objetivo principal de este estudio es el aislamiento y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) aplicables a especies forestales comerciales caracterizando los mecanismos inductores de crecimiento vegetal de las bacterias seleccionadas.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***2.1 Selección de sitio de colecta***

El sitio seleccionado para la recolección de material vegetal se basó en la distribución natural de las dos especies forestales seleccionadas. Para la especie *P. montezumae*, se realizaron muestreos en el Parque Nacional Malinche. Para *P. patula* la colecta se realizó en la Sierra de Tlaxco-Caldera-Huamantla.

### ***2.2 Aislamiento de bacterias rizosféricas***

Se aislaron a partir de suelo más adherido en la raíz de la plántula, por lo que éstas se trasladaron al laboratorio para realizar el aislamiento en condiciones asépticas. El protocolo de aislamiento fue establecido de acuerdo a Corral-Lugo *et al.* (2012) y Morales-García *et al.* (2013); 200 µl de muestra de cada dilución se colocaron en los medios de cultivo seleccionados para ser extendidos por plaqueo, las placas se realizaron por triplicado en Agar Extracto de Levadura Manitol pH 7 (Ahmad *et al.*, 2008) y Agar Nutritivo pH 6.8 (Poole *et al.*, 2001) con el fin de obtener bacterias lo suficientemente separadas para su

aislamiento, además de cuantificar de forma aproximada la abundancia de las bacterias que se están observando.

### ***2.3 Aislamiento de bacterias endófitas***

El aislamiento de BPCV endófitas se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Holguin *et al.* (1996). 200 µl de muestra de cada dilución se colocaron en los medios de cultivo seleccionados para ser extendidos por plaqueo.

### ***2.4 Criterios para la determinación de morfotipos***

Los análisis de datos de caracterización morfológica se realizaron empleando 32 marcadores morfológicos que representan las variables de evaluación de las características macroscópicas, las cuales fueron transformadas a datos binarios de correspondencia y no correspondencia (0,1; Gómez-Rivera *et al.*, 2016). Se efectuó un análisis multivariado con conglomerados para distinguir la distancia morfológica existente entre los organismos determinados mediante la representación gráfica de un dendograma con el programa PAST 3 Versión 3.16 (Noruega; Hammer *et al.*, 2001).

### ***2.5 Caracterización de las bacterias aisladas según su mecanismo de acción***

#### ***2.5.1 Detección de compuestos indólicos***

Se utilizó un método colorimétrico para detectar compuestos indólicos utilizando el reactivo Salkowski (Glickmann & Dessaux, 1995) en las ochenta y siete cepas bacterianas aisladas de las dos especies forestales según el procedimiento descrito por Glickmann & Dessaux (1995); Patten & Glick (2002) y Lara *et al.* (2011). Se determinó la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway modelo 6305) a una longitud de onda de 530 nm (OD530). Esta longitud de onda se eligió ya que se utiliza de forma rutinaria en ensayos colorimétricos de auxina derivados de Salkowski (Glickmann & Dessaux, 1995).

### **2.5.2 Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos**

Se determinó en medio de Pikovskaya modificado según el procedimiento descrito por Husen (2002); Lara *et al.* (2011); Laslo *et al.* (2012) y Kushwaha *et al.* (2013). Se calculó el tamaño de los halos por medio del Índice de Solubilización:  $IS=A/B$  (Donde: A= diámetro de la colonia + diámetro del halo y B= diámetro de la colonia). Se seleccionaron las cepas que muestran índices de solubilización mayores a 3 cm. Las mediciones se realizaron a los 3 y 7 días respectivamente después de la inoculación, con el fin de evaluar el comportamiento de las cepas a través de los días. Para determinar la cantidad de fósforo (P) insoluble que solubilizan las bacterias positivas con el medio Pikovskaya, se aplicó el método azul de molibdato de amonio y ácido ascórbico (Olsen & Sommers, 1982; Reeuwijk, 2002). Se midió la dinámica de solubilización de las bacterias analizadas en los días 0, 5, 10 y 15 para evaluar su rendimiento (Illmer & Schimer, 1992; Nautiyal *et al.*, 2000).

### **2.5.3 Actividad de quitinasa**

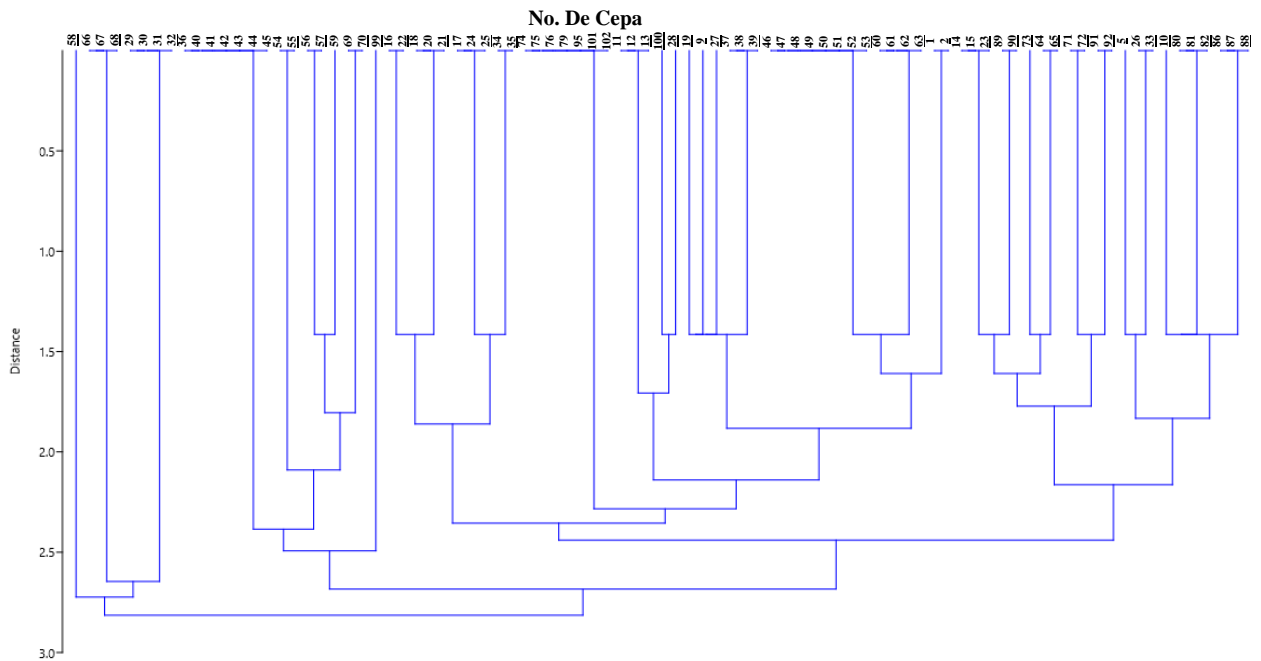
Las bacterias aisladas se sembraron en agar quitina coloidal (Hsu & Lockwood, 1975). Después de incubación a 20 °C durante 20 días, se evaluó el crecimiento bacteriano y la presencia de halos alrededor de las colonias que representan evidencia de la degradación de quitina (Bending *et al.*, 2002).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Colecta de muestras**

Se realizaron dos colectas en el Parque Nacional Malinche y una colecta en la Sierra de Tlaxco-Caldera-Huamantla. En cada uno de los sitios seleccionados se realizó un recorrido identificando las plántulas viables para el aislamiento de BPCV. Los criterios que se emplearon para la selección de plántulas fueron: sin plaga ni daño alguno, con buenas características fenológicas, hojas sin clorosis. A cada uno de los ejemplares seleccionados se les realizaron mediciones dasométricas y humedad del suelo. Las plántulas se transportaron al laboratorio en su totalidad para realizar el aislamiento en condiciones asépticas.

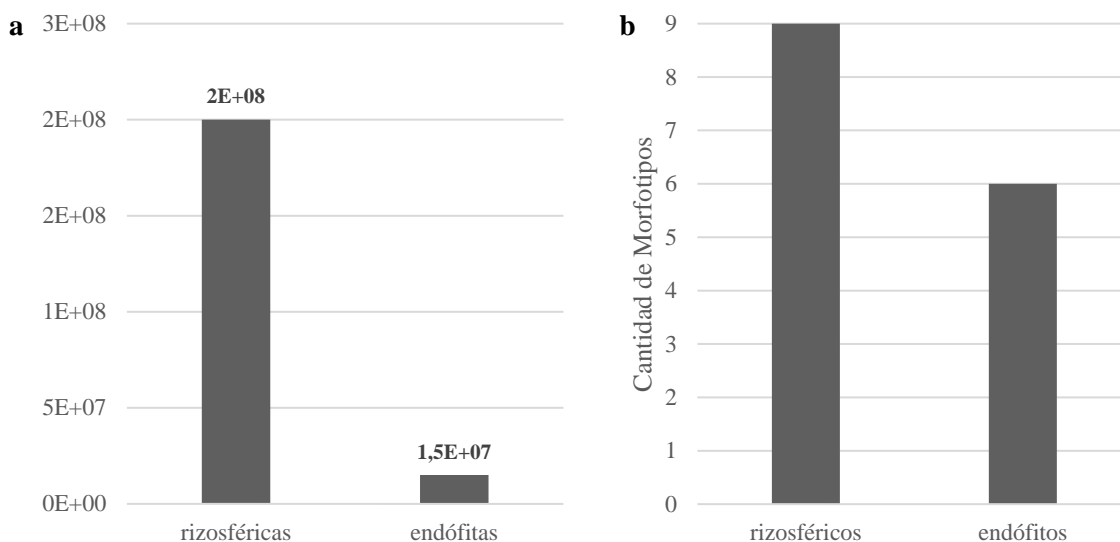
Como resultado de la caracterización morfológica mediante el análisis estadístico por conglomerados, se obtuvo un dendograma basado en los morfotipos determinados que exhibe el grado de distancia entre ellos (Fig. 1). Se obtuvieron 35 morfotipos bacterianos aislados de las dos especies de coníferas descritas en este estudio.



**Fig. 1.** Caracterización morfológica de los microorganismos aislados de *P. montezumae* y *P. patula*.

### 3.2 Aislamiento de bacterias de *P. montezumae* (Parque Nacional Malinche)

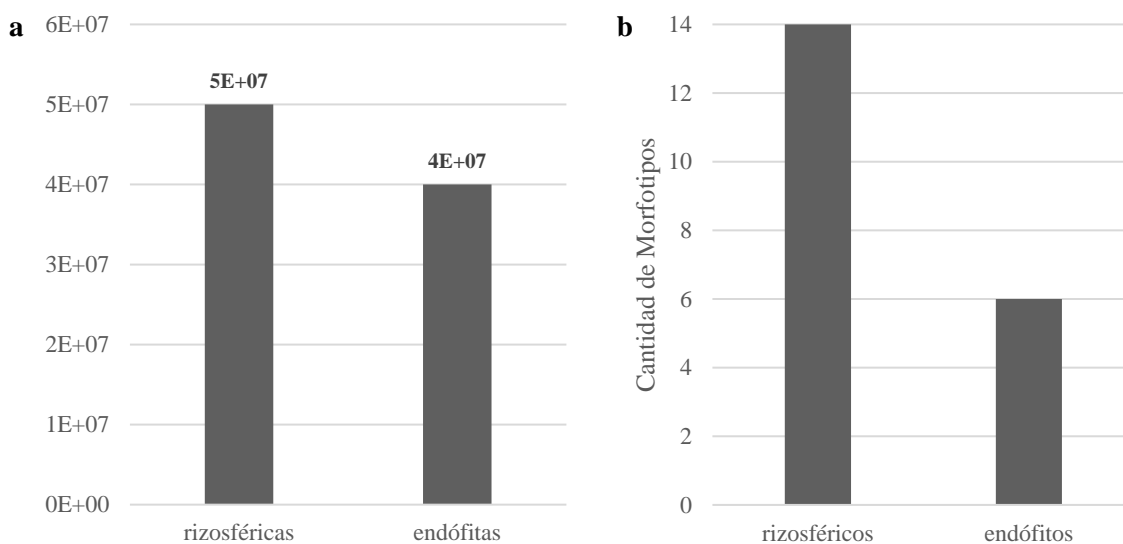
Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC), dando como resultado  $2 \times 10^8$  para bacterias rizosféricas y  $1.5 \times 10^7$  para endófitas. Se aislaron un total de 30 cepas de las cuales 17 pertenecen a la rizósfera y 13 a la raíz. Se caracterizaron 15 morfotipos, 9 corresponden a la rizósfera y 6 a la raíz (Fig. 2).



**Fig. 2.** a) Cantidad de UFC/ml y b) morfotipos aislados del microbioma de la raíz de *P. montezumae*.

### 3.3 Aislamiento de bacterias de *P. patula* (Sierra de Tlaxco-Caldera-Huamantla)

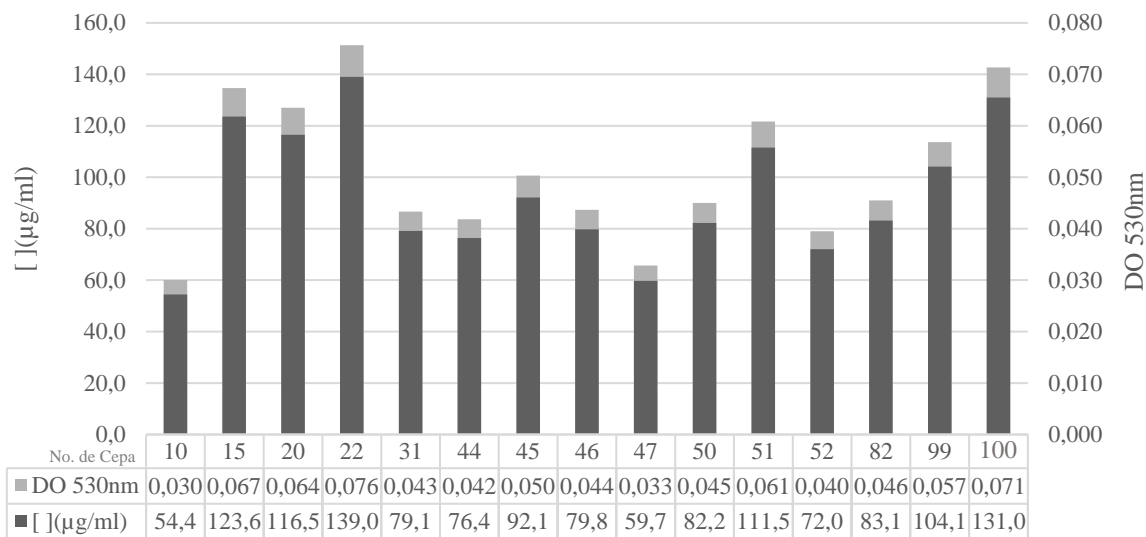
Se determinaron las UFC, dando como resultado  $5 \times 10^7$  para bacterias rizosféricas y  $4 \times 10^7$  para endófitas. Se aislaron un total de 57 cepas de las cuales 41 pertenecen a la rizósfera y 16 a la raíz. Se caracterizaron 20 morfotipos, 14 corresponden a la rizósfera y 6 de la raíz (Fig. 3).



**Fig. 3.** a) Cantidad de UFC/ml y b) morfotipos aislados del microbioma de la raíz de *P. patula*.

### 3.4 Caracterización de las bacterias aisladas según su mecanismo de acción

#### 3.4.1 Detección de compuestos indólicos



**Fig. 4.** Rangos en la producción de compuestos indólicos por las cepas aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

Quince cepas fueron positivas a la prueba de detección de compuestos indólicos con el reactivo Salkowski obteniendo un color rojo claro con valores que van de 54.4 a 139 µg/ml. Cuatro cepas se aislaron de la rizósfera y una endófito de *P. montezumae*. En cuanto a las cepas aisladas de *P. patula*, un total de siete fueron rizosféricas y tres endófitas. En esta investigación se preparó el reactivo de Salkowski con ácido sulfúrico y se probó a diferentes relaciones estableciéndose la 1:4 como la de mejor sensibilidad para la determinación de las concentraciones. La cepa C22MPm aislada de *P. montezumae* es la mayor productora de índoles según los datos arrojados por la prueba colorimétrica con concentración de índoles de 139 µg/ml (Fig. 4).

#### 3.4.2. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos

Seis cepas resultaron positivas en la prueba de Solubilización de fosfatos con el medio Pikovskaya mostrando zonas claras alrededor de la colonia, lo que indica que estas bacterias solubilizan fosfato inorgánico insoluble. El rendimiento mostrado por estas bacterias en cuanto al Índice de Solubilización (IS) aplicado fue de 3.2 a 3.8. La cepa con un IS más alto fue la C21MPm con 3.8 aislada de *P. montezumae*, en contraste con las cepas aisladas de *P. patula* que tuvieron todas un IS de 3.2 (Tabla 1). Las cepas de *P. montezumae* y *P. patula* que presentaron halos en el medio Pikovskaya fueron aisladas de la rizósfera de estas especies de pinos. Veintiséis cepas resultaron positivas para el método azul de molibdato de amonio y ácido ascórbico, solubilizando P en cantidades que varían de 0.1 a 2.4 mg/L. En estas condiciones de incubación, la cepa C12MPm fue la más eficiente para solubilizar fosfato seguido de las cepas C42STPp, C44STPp, C21MPm y

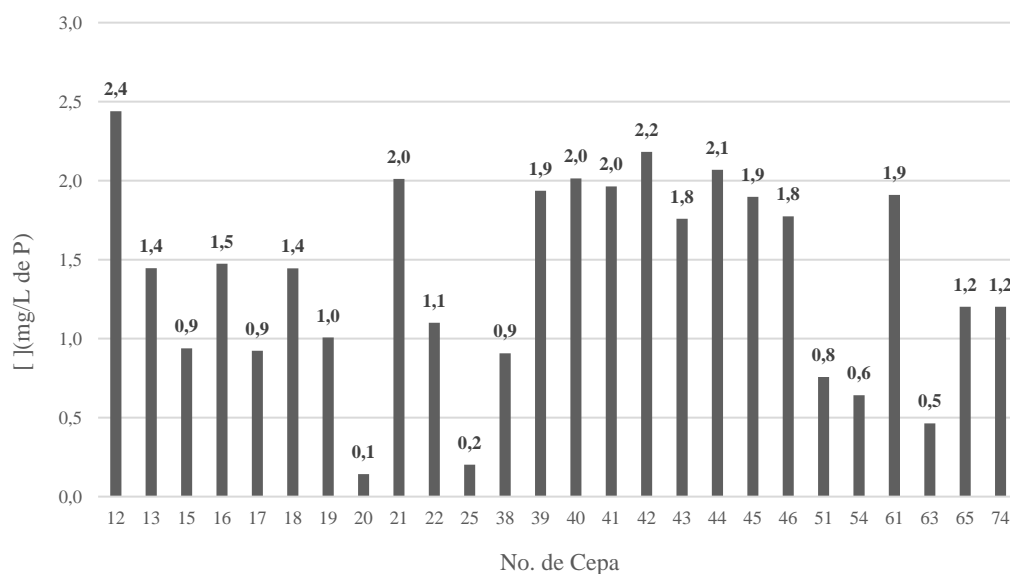


C40STPp en orden decreciente de eficiencia (Fig. 5). El mayor rendimiento en las cepas sucedió en los días 5 al 10 en donde solubilizaron P exponencialmente. Se observó que después del día 10 el rendimiento comenzó a declinar, sin embargo, tres cepas presentaron rendimientos bajos en los primeros cinco días y se disparó su rendimiento a partir del sexto día teniendo su punto máximo el día 10 (Fig. 6). En términos de captación microbiana de P, hubo diferencias importantes entre las cepas evaluadas por la cantidad de este elemento solubilizado. Este hallazgo proporciona evidencia de que la inoculación de estas bacterias estimula la solubilización principalmente de fosfato tribásico o hidroxipatito.

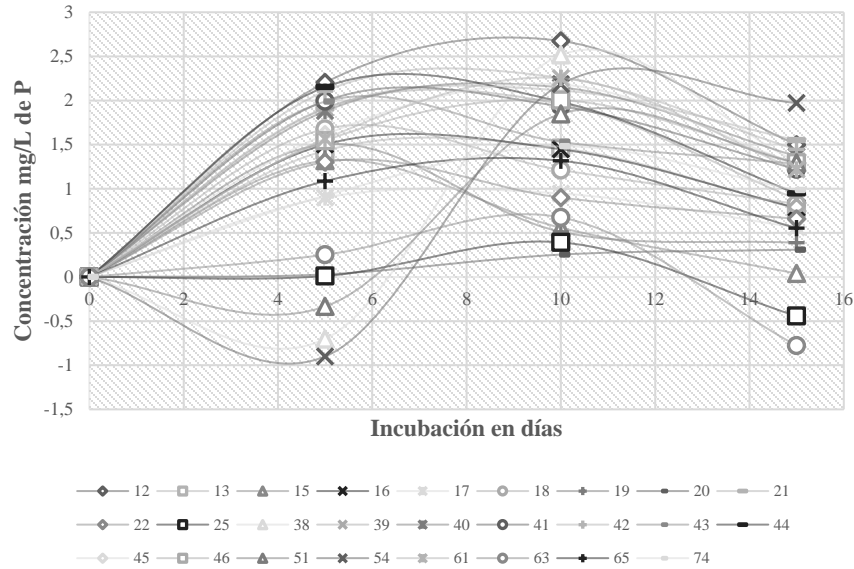
**Tabla 1.** Rendimiento por cepa de la prueba de solubilización de fosfatos e índice de solubilización de las diferentes cepas aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

Cepa	Sustrato	Especie	Tamaño del halo (cm)	Tamaño de colonia (cm)	Índice de solubilización (cm)	Desviación estándar*
C20MPm	Rizósfera	<i>P. montezumae</i>	1.1	0.5	3.2	±0.1
C21MPm	Rizósfera	<i>P. montezumae</i>	0.85	0.3	3.8	±0.1
C22MPm	Rizósfera	<i>P. montezumae</i>	1.1	0.45	3.6	±0.08
C38STPp	Rizósfera	<i>P. patula</i>	1.3	0.65	3.2	±0.1
C52STPp	Rizósfera	<i>P. patula</i>	1.3	0.5	3.2	±0.1
C61STPp	Rizósfera	<i>P. patula</i>	1.2	0.55	3.2	±0.3

\*Promedio ± del error estándar en los tres experimentos realizados por separado.



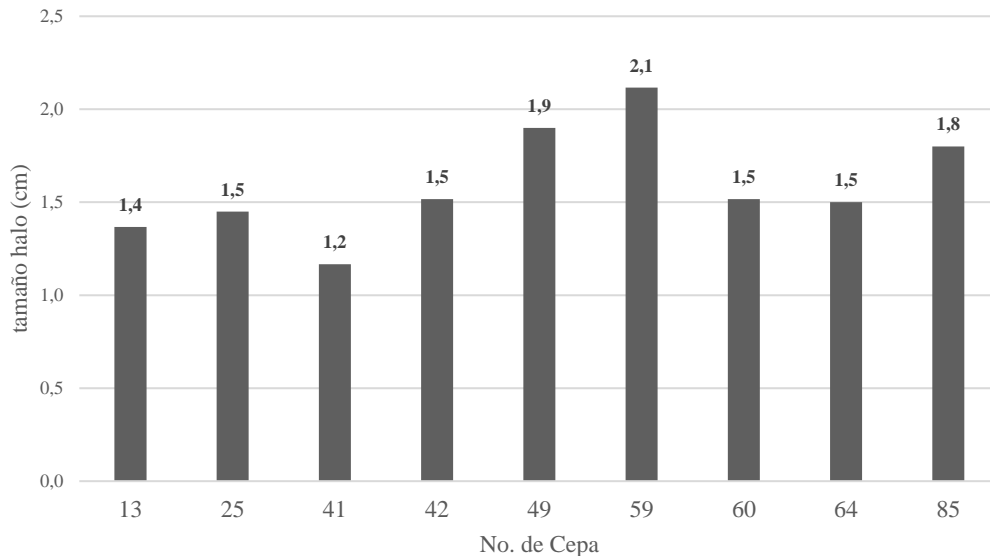
**Fig. 5.** Rangos de rendimiento de las cepas solubilizadoras de fosfato aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.



**Fig. 6.** Dinámica de la solubilización de fosfato realizado por las cepas evaluadas durante la incubación de 15 días.

### 3.4.3. Producción de Quitinasa

Nueve cepas presentaron crecimiento y halos alrededor de las colonias en Agar Quitina Coloidal después de siete días de incubación a 30°C, con rangos en el tamaño de los halos de 1.2 a 2.1 cm (Fig. 7). Todas las cepas seleccionadas crecieron bien en agar de quitina y tuvieron un rendimiento superior en la producción de quitinasa mostrando zonas claras alrededor de las colonias. Dos cepas se aislaron de la rizósfera de *P. montezumae* y siete de *P. patula* de diferentes sustratos, seis de la rizósfera y una endófito.



**Fig. 7.** Rangos en el halo alrededor de las colonias de las cepas productoras de quitinasa aisladas de *P. montezumae* y *P. patula*.

#### 4. DISCUSIÓN

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas se han aislado a partir de diversos ambientes entre los que destaca la rizósfera de plantas, la región endófito y la epífita (Brader *et al.*, 2014; Molina-Romero *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2017). El aislamiento de bacterias con potencial promotor del crecimiento de árboles ha sido menos explorado (Yaish *et al.*, 2015; Méndez-Bravo *et al.*, 2018; Marupakula *et al.*, 2016), pero representa un campo importante para la productividad de algunos frutos y para la reforestación de zonas boscosas. En el presente trabajo se obtuvieron varios aislados de la rizósfera y la región endófito de *P. patula* y *P. moctezumae*; dos especies de relevancia para la reforestación de zonas boscosas de México. Esos aislados poseen características implicadas en la promoción del crecimiento vegetal.

En la recuperación de cepas bacterianas a partir de la rizósfera y la raíz de *P. patula* y *P. montezumae*, se observó una heterogeneidad en lo que respecta a la distribución de los microorganismos, recuperando una mayor cantidad de cepas de la rizósfera en comparación al interior de la raíz. Los microorganismos no están distribuidos regularmente en el suelo pues hay un mosaico discontinuo de microambientes. Aquéllos favorables para el desarrollo microbiano se caracterizan por su limitada extensión en el tiempo y en el espacio. El microbioma (rizosférico y endofítico) puede desarrollarse sobre la base de presiones de selección positivas y negativas que se producen como resultado de la composición de exudados radiculares (Glick, 2015). Las bacterias del suelo dependen en gran medida de fuentes exógenas de carbono tanto para la energía, como para el crecimiento y desarrollo. La liberación de ciertos compuestos específicos, por las raíces de las plantas, seleccionan el número limitado de bacterias que son capaces de utilizar esos compuestos (Compant *et al.*, 2010). Además, los exudados de raíz son generalmente específicos de plantas y el uso de

estos compuestos específicos a menudo actúa como señales para establecer la afinidad de una planta para bacterias particulares (Glick, 2015). El proceso por el cual las bacterias se mueven hacia la raíz y la colonizan, no es muy claro. No obstante, se han propuesto algunos factores que favorecen este proceso, como: mayor disponibilidad de carbono, condiciones favorables de humedad, tiempo de generación y quimiotaxis, aerotaxis, adhesión y la capacidad de movimiento (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

Los mecanismos implicados en la promoción del crecimiento son variados, estos pueden ser directos o indirectos (Molina-Romero *et al.*, 2015). Los mecanismos directos incluyen la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas y la producción de ACC desaminasa y los mecanismos indirectos incluyen el antagonismo de fitopatógenos, la inducción de una respuesta de defensa mediada por etileno y la formación de compuestos volátiles. En nuestro trabajo se exploraron algunas de las características implicadas en la promoción del crecimiento vegetal, por ejemplo la producción de ácido indolacético; una hormona efectiva para promover el crecimiento de diversas plantas (Ahemad *et al.*, 2014). La producción de compuestos indólicos se ha reportado en diversos trabajos (Rashid *et al.*, 2012; Lara *et al.*, 2011; Carcaño-Montiel *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008; Pedraza *et al.*, 2004; Patten & Glick, 2002) y sus valores varían desde 3 hasta 88 µg/ml en cepas de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Agrobacterium*, *Bacillus* y *Rhodococcus*. En el presente trabajo, los valores de producción de compuestos indólicos variaron en el rango de 54.4 a 139 µg/ml, mostrando un rendimiento mayor en cuanto a la producción de estos compuestos. Se ha reportado que un porcentaje alto de bacterias rizosféricas (típicamente ~ 85%) sintetiza ácido indolacético (AIA) y lo utiliza como una fuente de carbono para su crecimiento (Glick, 2015). El reactivo de Salkowski empleado en el método colorimétrico permite la oxidación de los compuestos indólicos por sales férricas; cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso dependiendo de la concentración del ácido indol-3-acético (AIA) presente (Lara *et al.*, 2011). Sin embargo, colores rojizos son un indicativo de la producción de AIA y ácido indol pirúvico (AIP) (Glickmann & Dessaux, 1995); como se observó en nuestro trabajo. En microorganismos se han propuesto, al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis de AIA a partir de triptófano (Trp) (Patten & Glick, 1996), siendo las más predominantes la vía del indol 3-pirúvico (AIP) y ácido 3-acetamida (AIM) (Cassán *et al.*, 2008). Existe un patrón de biosíntesis de AIA característico de la interacción planta-microorganismo que depende específicamente de rol ecofisiológico de la especie bacteriana que interactúa, siendo estas fitopatógenas o promotoras del crecimiento (Lambrecht *et al.*, 1999).

Una concentración considerablemente mayor de bacterias solubilizadoras de fosfato se encuentra comúnmente en la rizósfera en comparación con el suelo no rizosférico (Rodríguez & Fraga, 1999). Los fosfatos se ponen a disposición por las raíces de las plantas o por microorganismos del suelo, por lo tanto, estos desempeñan una función en la corrección de la deficiencia de fósforo de las plantas (Subba Rao, 1977). Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados por otros autores como Laslo *et al.* (2012), en donde el 64% de las bacterias aisladas que presentan actividad solubilizadora, fueron aislados de suelo. Lara *et al.* (2011), obtuvieron valores de bacterias solubilizadoras con respecto al diámetro del halo que van de 6 a 18 mm, con índices de solubilización de entre 1.5 a 4.2 mm de diámetro. Los valores obtenidos por las cepas aisladas en este trabajo son

superiores a los reportados, ya que se obtuvieron rangos con valores de 3.2 a 3.8 cm. El monitoreo del rendimiento de solubilización de P se midió en trabajos como los de Nautiyal *et al.* (2000), en donde la solubilización máxima de fosfato se logró después de 3 días de incubación, sin embargo, la incubación adicional hasta el día 5 no mejoró el grado de solubilización. Por otro lado, las cepas evaluadas en este estudio incrementaron la solubilización de fosfato entre los días 5 y 10. De igual manera, el pH en el medio disminuyó hasta valores de entre 6.3 a 6.7. Existe un estrecho vínculo entre el pH ácido y la eficiente solubilización de P, la disminución del pH indica claramente la producción de ácidos, que se considera responsable de la solubilización de P. Se ha sugerido que los microorganismos que disminuyen el pH del medio durante el crecimiento son solubilizadores de P eficaces. Se ha encontrado que los ácidos orgánicos pueden incrementar significativamente la concentración de P en el suelo a través de la quelación y reacciones de intercambio (Reyes *et al.*, 2001). La producción de ácidos carboxílicos, como el ácido cítrico y el ácido oxálico, está asociada con la solubilización de fosfato cálcico por *Penicillium bilaii* (Cunningham & Kuyack, 1992); el ácido glucónico estuvo implicado en la solubilización de fosfato de roca por *Penicillium variabile* (Vassilev *et al.*, 1996).

Bending *et al.* (2002) aislaron bacterias de *Pinus sylvestris*, en donde dos de estas cepas presentaban crecimiento en el agar quitina coloidal con halos claros alrededor de las colonias de hasta 2 cm; siete crecían en el agar con halos hasta 2mm; solo tres crecían en el agar, pero no presentaban halos. En contraste, en el presente trabajo nueve cepas presentaron crecimiento y halos alrededor de las colonias en Agar Quitina Coloidal después de siete días de incubación con rangos en el tamaño de los halos de 1.2 a 2.1 cm. Con lo que respecta al microhábitat de las cepas productoras de quitinasa, estas se encuentran en los dos microbiomas evaluados. Las bacterias productoras de quitinasa se encuentran tanto en la rizósfera como en el interior de la planta, esto obedece a que las plantas pueden "seleccionar" su microbioma para tener colonizadores bacterianos beneficiosos, incluyendo aquellos que viven dentro de los tejidos vegetales (Santoyo *et al.*, 2016). Las BPCV se comportan como agentes de biocontrol mediante la producción de enzimas tales como la quitinasa, celulosa, b-1,3 glucanasa, proteasa o lipasa, que inducen la lisis de paredes celulares de hongos (Chet & Inbar, 1994). En particular, la quitinasa se considera crucial para la actividad de biocontrol exhibida por BPCV frente a hongos fitopatógenos (Gamalero & Glick, 2011) como *Botrytis cinerea* (Frankowski *et al.*, 2001), *Sclerotium rolfsii* (Ordentlich *et al.*, 1988), *Fusarium Oxysporum* f.sp. Cucumerinum (Singh *et al.*, 1999), *Phytophthora* (Kim *et al.*, 2008), b-glucanasa para la supresión de *R. solani* y paredes celulares de *Pythium ultimum* (Frankowski *et al.*, 2001; Ordentlich *et al.*, 1988).

## 5. CONCLUSIONES

Con este trabajo se propone una forma de enriquecer la población microbiana en suelos en proceso de reforestación, mediante la siembra de plantas inoculadas en vivero que lleven en la rizósfera altas poblaciones microbianas benéficas, de esta forma la planta actúa como medio para reintroducir estos microorganismos al suelo y además al sembrarlas con microflora benéfica asociada, se incrementa su crecimiento temprano y se mitiga el estrés, desencadenado en un mejor proceso de adaptación al suelo, en relación a plantas no inoculadas en vivero.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Ahemad M. & Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26(1): 1-20.

Ahmad F., Ahmad I. & Khan M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163: 173-181.

Bending G. D., Poole E. J., Whipps J. M. & Read D. J. 2002. Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 219-227.

Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F. & Sessitsch A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30–37.

Cassán F., Sgroy V., Perrig D., Masciarelli O. & Luna V. 2008. Producción de fitohormonas por *Azospirillum sp.* Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: Cassán, F. & García de Salamone, I. (Eds.), *Azospirillum sp.*, cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. 61-78 p.

Chet I. & Inbar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 48:37–43.

Compant S., Clément C. & Sessitsch A, 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 669-678.

Corral-Lugo A., Morales-García Y. E., Pazos-Rojas L. A., Ramírez-Valverde A., Martínez-Contreras R. D. & Muñoz-Rojas J. 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología* 14 (2) pp. 147-156.

Cunningham J. E. & Kuiack C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1451-1458.

Fierros A., Noguéz A. & Velasco E. 1999. Paquetes Tecnológicos para el establecimiento de plantaciones forestales comerciales en ecosistemas de climas templados-fríos y tropicales de México. Vol. 1. Subsecretaría de Recursos Naturales, Dirección General Forestal y Dirección de Plantaciones Comerciales Forestales. SEMARNAP. México, D.F.

- Frankowski J., Lorito M., Scala F., Schmidt R., Berg G. & Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Arch. Microbiol. 176:421–426.
- Gamalero E. & Glick B. R. 2011. Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management, Maheshwari, D. K. (Ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 17-46.
- Glickmann E. & Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61 (2): 793-796.
- Glick B. R. 2015. Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. In: Beneficial plant-bacterial interactions. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 1-26
- Glick B. R. 2015. Modulating Phytohormone Levels. In: Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 65-94.
- Gómez-Rivera, A. S., Yuridia-López C., Martínez-Burgos M. & Cachón-Mis, X. J. 2016. Caracterización morfológica de hongos endófitos aislados de *Hamelia patens* Jacq. y *Lantana camara* L. de Chetumal, Quintana Roo, México. Teoría y Praxis 19 pp. 33-44.
- Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Paleontología Electrónica (4) pp. 1-9.
- Holguin G., Bashan Y. & Ferrera-Cerrato R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas. Terra. 14(2).
- Hsu S. C. & Lockwood J. L. 1975. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. Appl. Microbiol. 1975, 29(3): 422-426.
- Husen E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. Indonesian Journal of Agricultural Science. 4(1) 27-31.
- Kim Y. C., Jung H., Kim K. Y. & Park, S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. Eur. J. Plant Pathol. 120:373–382.
- Lambrecht M., Okon Y., Vande Broek A. & Vanderleyden, J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. Trends Microbiol. 8:298-300.
- Lara C., Oviedo L. & Alemán A. 2011. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 9 (1): 17-23.

Lara C., Esquivel-Ávila L. M. & Negrete-Peñata J. L. 2011. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotecnología en el sector Agropecuario e Industrial* 9 (2) 114-120.

Laslo E., György E., Mara G., Tamás E., Ábrahám B. & Lányi S. 2012. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection* 40: 43-48.

Loredo-Osti C., López-Reyes L. & Espinosa-Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22(2): pp. 225-239.

Lucy M., Reed E. & Glick, B. R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1–25.

Marupakula, S., Mahmood S. & Finlay, R. D. 2016. Analysis of single root tip microbiomes suggests that distinctive bacterial communities are selected by *Pinus sylvestris* roots colonized by different ectomycorrhizal fungi. *Environmental Microbiology* 18(5): 1470–1483.

Masera O., Bellon M. R. & Segura G. 1997. Forestry Options for Sequestering Carbon in Mexico: Comparative Economic Analysis of Three Case Studies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 27(suppl.): 227-244.

Méndez-Bravo A., Cortazar-Murillo E.M., Guevara-Avendaño E., Ceballos-Luna O., Rodríguez-Haas B., Kiel-Martínez A. L. Hernández-Cristóbal O., Guerrero-Analco J. A. & Reverchon F. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLOS ONE* 13(3): e0194665.

Molina-Romero D., Bustillos-Cristales M. R., Rodríguez-Andrade O., Morales-García Y. E., Santiago-Saenz Y., Castañeda-Lucio M. & Muñoz-Rojas J. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17(2): 24–34.

Morales-García Y. E., de la Torre-Zúñiga J., Duque de Oliva E., Pérez y Terrón R., Martínez-Martínez L., Martínez –Contreras R. & Muñoz-Rojas J. 2013. Aspectos críticos a considerar para el aislamiento de bacterias benéficas. *Revista de divulgación Científica, Tecnológica y Humanística*. Concytep.

Nautiyal C. S., Bhadauria S., Kumar P., Lal H. & Mondal, R. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils, 182.

Niembro A. 1986. *Árboles y Arbustos Útiles de México*. Limusa. México D.F.

Olsen S. R. & Sommers L. E. 1982. Phosphorus. *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 9(9), 403–430.



Ordentlich A., Elad Y. & Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78:84–88.

Orozco-Jaramillo C. & Martínez-Nieto P. 2009. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *BOSQUE* 30 (2): 70-77.

Patten C. & Glick B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.

Poole E. J., Bending G. D., Whipps J. M. & Read D. J. 2001. Bacteria associated with *Pinus sylvestris* *Lactarius rufus* Ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytol.* 151: 743–751.

Reeuwijk L. 2002. Procedures for soil analysis (6th ed.). Technical Paper 9, International Soil Reference and Information Centre, Wageningen. Retrieved from <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/546300>

Reyes I., Baziramakenga R., Bernier L. & Antoun, H. 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biology & Biochemistry.* 33, 1741-1747.

Rodríguez H. & Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319–339.

Rosete-Vergés F. A., Pérez-Damián J. L., Villalobos-Delgado M., Navarro-Salas E. N., Salinas-Chávez E. & Remond-Noa R. 2014. El avance de la deforestación en México 1976-2007. *Madera y Bosques*, 20 (1): 21-35.

Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda M. C. & Glick, B. R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183 pp 92–99.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2012. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales. México, D.F.

Singh P. P., Shin Y. C., Park C. S. & Chung, Y. R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89:92–99.

Subba Rao N. S. 1977. *Soil Microorganisms and Plant Growth*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.

Pin Su P., Xinqiu Tan X., Chenggang Li C., Deyong Zhang D., Ju'e Cheng J., Songbai Zhang S., Xuguo Zhou X., Qingpin Yan Q., Jing Peng J., Zhuo Zhang Z., Yong Liu Y., & Xiangyang Lu X. 2017. Photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* GJ-22 induces systemic resistance against viruses. *Microbial Biotechnology* 10, 612–624.

Vassilev N., Fenice M. & Federic, F. 1996. Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable* P16. *Biotechnology Techniques*. 10, 585-588.

Velázquez A. & Bocco G. 2003. La ecología del paisaje y su potencial para acciones de conservación de ecosistemas templados de montaña; En: Sánchez, O. Monroy, E. Vega, E. Peters, and C. Donovarros (comps.). *Conservación de Ecosistemas Templados de Montaña en México*. Instituto Nacional de Ecología. 306 p.

Yaish M. W., Antony I. & Glick B. R. 2015. Isolation and characterization of endophytic plant growthpromoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek* 107:1519–1532.