



**Efecto de Microorganismos Bioestimulantes en la Morfometría de Lactuca Sativa L. bajo un Sistema Hidropónico de Raíz Flotante**

**Biostimulant Microorganisms Effect on the Morphometry of Lactuca sativa L. Under Hydroponic System of Floating Root**

Ana Sofia Pineda-Acosta<sup>1</sup>, Liliana Lara-Capistrán<sup>1</sup>, Luis G. Hernández-Montiel<sup>2</sup>,

Guillermo Alafita-Vásquez<sup>1</sup> y Ramón Zulueta-Rodríguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, *Campus* Xalapa, Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C.P. 91000, Xalapa, Veracruz, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Calle Instituto Politécnico Nacional No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, C.P. 23096, La Paz, Baja California Sur, México.

\*Autor de correspondencia: [rzulueta36@hotmail.com](mailto:rzulueta36@hotmail.com)

Recibido 20 de septiembre 2021; recibido en forma revisada 16 de noviembre de 2021; aceptado 12 de diciembre de 2021

## RESUMEN

En la actualidad, el uso de microorganismos bioestimulantes ha demostrado su eficacia para promover el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, poco se sabe de su respuesta en sistemas de raíz flotante. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diversos microorganismos bioestimulantes en parámetros morfométricos de *Lactuca sativa* L. cv. 'Parris Island' bajo cultivo hidróponico de raíz flotante con solución nutritiva Steiner en invernadero. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos: T1 Testigo, (T), T2 *Azospirillum brasilense* (Ab), T3 *Trichoderma harzianum* (Th), T4 *Bacillus subtilis* (Bs) y T5 Bs+Th+Ab, cada uno con 14

repeticiones y disposición total de 70 unidades experimentales. Se evaluó altura de planta y número de hojas a los 7, 14, 21 y 28 días después del trasplante (DDT), biomasa fresca, área foliar, volumen radical y unidades formadoras de colonias (UFC) a los 28 DDT. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y contraste de mínima diferencia significativa (HSD) de Tukey, con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0.05$ ). El ANOVA marcó diferencias significativas en todas las variables, siendo *Ab* el mejor tratamiento en todas ellas con incrementos de 13.79 %, 72.22 %, 197 %, 203.93 % y 106 % con respecto a las plantas-testigo, y con relación a las UFC·g<sup>-1</sup> presentes en cada tratamiento el recuento fue de 10 en *Ab*, 12 en *Th*, 5 en *Bs* y 22 en *Bs+Th+Ab*. Se concluye que *Ab* fue el mejor tratamiento debido a su adaptación a medios con oxígeno o en ausencia de este, tal y como ocurre en estos sistemas de producción.

**Palabras clave:** Lechuga orejona 'Parris Island', *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*.

### ABSTRACT

Nowadays, the use of biostimulant microorganisms has proven to be effective in promoting crop yields. However, little is known about its response in floating root systems. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of various biostimulant microorganisms on morphometric parameters of *Lactuca sativa* L. cv. 'Parris Island' under hydroponic floating root culture with Steiner nutrient solution in greenhouse. A completely random experimental design was used with five treatments: T1 Control, (T), T2 *Azospirillum brasilense* (*Ab*), T3 *Trichoderma harzianum* (*Th*), T4 *Bacillus subtilis* (*Bs*) and T5 *Bs+Th+Ab*, each with 14 repetitions and total arrangement of 70 experimental units. Plant height and number of leaves were evaluated at 7, 14, 21 and 28 days after transplantation (DDT), fresh biomass, leaf area, radical volume and colony-forming units (CFUs) at 28 DDT. The results obtained were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's least significant difference (HSD) contrast, with a significance level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ). The ANOVA marked significant differences in all the variables, being *Ab* the best treatment in all of them with

increases of 13.79 %, 72.22 %, 197 %, 203.93 % and 106 % with respect to the control-plants, and in particular relation to the CFU·g<sup>-1</sup> present in each treatment the count was 10 in *Ab*, 12 in *Th*, 5 in *Bs* and 22 in *Bs+Th+Ab*. It is concluded that *Ab* was the best treatment due to its adaptation to means with low levels or no oxygen, as it occurs in these production systems.

**Keywords:** Cos romaine lettuce 'Parris Island', *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*.

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento exponencial de la población y la degradación de los suelos agrícolas causan preocupación por el ineludible abastecimiento de alimentos. Y es precisamente en ese contexto donde la tecnología juega un trascendente papel y evoluciona tanto en pro del aumento de la productividad como de la sustentabilidad mediante la inclusión de avances científicos y técnicos de alto impacto sobre el rendimiento y la calidad del producto cosechado, tal como se procede en la agricultura de precisión y/o en los sistemas especializados de riego y nutrición, entre otros.

Los cultivos protegidos sin suelo apuestan a este mismo objetivo, haciendo posible un alto rendimiento en menos superficie y durante todo el año (Pertierra y Quispe, 2020). Y es en este sentido donde los cultivos hidropónicos con recirculación de solución nutritiva son una de las alternativas agroproductivas con mayor eficiencia económica y ambiental debida al ahorro considerable en agua e insumos, y mínimo vertido de solución fertilizante residual al ambiente (Urrestarazu, 2015), en comparación con el establecimiento de un cultivo convencional o de producción de biomasa

vegetal a partir de la germinación y crecimiento de semillas de cereales en espacios abiertos (en campo) (Juárez-López *et al.*, 2013).

Dentro de los sistemas hidropónicos destacan los sistemas de raíz flotante, los cuales han demostrado su valía y bajo costo para cultivar hortalizas de hoja exitosamente (Karnoutsos *et al.*, 2021).

Aunado a ello, la utilización de bioestimulantes en la agricultura es cada vez más frecuente tanto por la demanda nutricional focalizada en cultivos estratégicos donde se requiere incentivar procesos que tengan un impacto positivo en el crecimiento, el rendimiento, la composición química y la estimulación de la tolerancia de las plantas a factores bióticos y abióticos estresantes (Shahrajabian *et al.*, 2021).

Dentro de los microorganismos que actúan sobre la fisiología de las plantas destacan *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* pero se necesita más información sobre el efecto, ventajas y desventajas que de ellos se puedan derivar al ser elegidos como bioestimulantes naturales en el cultivo hidropónico de especies hortícolas en raíz flotante. Por ello, el objetivo del presente estudio fue

evaluar el efecto de diversos microorganismos bioestimulantes en los parámetros morfométricos de *Lactuca sativa* L. cv. 'Parris Island' bajo un sistema hidropónico de producción en raíz flotante con solución nutritiva Steiner en invernadero.

## METODOLOGÍA

El presente estudio se efectuó durante los meses mayo-junio de 2021 en un invernadero, tipo capilla, ubicado en la ciudad de Xalapa, Veracruz, México, cuyas coordenadas geográficas son 19°33'05.37''LN, 96°56'40.64''LO y elevación de 1,428 msnm, con temperaturas que oscilaron entre 14 y 31 °C, con presencia de 12 h y 52 min de energía lumínica en el día más corto y de 13 h y 19 min en el más largo, con mayor temperatura diaria de ca. 13:00 a 16:00 h (Weather Spark, 2021).

### Diseño experimental y descripción de los tratamientos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos y 14 repeticiones: T1 Testigo absoluto (T), T2 *Azospirillum brasilense* (Ab), T3 *Trichoderma harzianum* (Th), T4 *Bacillus subtilis* (Bs) y

T5 *Bs+Th+Ab*, con disposición total de 70 unidades experimentales.

### Establecimiento de semilleros e inoculación con microorganismos bioestimulantes

Las semillas de lechuga orejona (*L. sativa*) cv. 'Parris Island' se colocaron en una charola germinadora de unicel con 200 cavidades, las cuales se habían llenado previamente con Peat Moss (o turba de *Sphagnum* canadiense orgánico) como sustrato, el cual se humedeció a capacidad de campo. A continuación, se aplicaron los inoculantes microbianos *A. brasilense*, *T. harzianum* y *B. subtilis* asperjados en el semillero inmediatamente después de la siembra a una dosis de 2 g·L<sup>-1</sup> agua y concentración de 500 millones de bacterias·g<sup>-1</sup>, de 10<sup>-4</sup> conidios·mL<sup>-1</sup> agua y de 10<sup>-9</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

### Preparación de los sistemas de raíz flotante

Se instalaron 15 cajas de plástico de polipropileno con capacidad de 61 L cada una, previamente desinfectadas y etiquetadas.

Como estructura de soporte para las plántulas, se adaptaron láminas de unicel de 2 cm de grosor cortadas a la medida de las cajas (43.5 x 79 cm) a las que se

realizaron 14 perforaciones distribuidas equitativamente y al tamaño de las canastillas para sistemas de raíz flotante, marca Hydro Environment, que sirvieron como soporte para las plántulas durante su desarrollo vegetativo. Por último, al fondo de cada caja se colocó una manguera perforada, conectada a una bomba de oxigenación, que permaneció en funcionamiento durante todo el ciclo productivo.

### **Preparación de la solución nutritiva**

La solución nutritiva para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas, estuvo en función a tres Soluciones que se prepararon con base en la mezcla de los siguientes elementos esenciales: Solución A: Nitrato de potasio<sup>1</sup>, nitrato de amonio<sup>2</sup>, fosfato monopotásico<sup>2</sup>; Solución B: Sulfato de magnesio<sup>2</sup>, sulfato de potasio<sup>2</sup>, quelato de hierro<sup>2</sup>, sulfato de manganeso<sup>3</sup>, sulfato de zinc<sup>3</sup>, sulfato de cobre<sup>3</sup>, molibdato de amonio<sup>3</sup> y Solución C: Nitrato de calcio<sup>2</sup>. Estos tres medios acuosos se mezclaron y colocaron en un recipiente de 750 L, para ser distribuidos en las 15 cajas establecidas para hidroponía. El pH y la conductividad se

monitorearon de manera regular para mantenerlos a 6.6 y 2 dS/m durante todo el ciclo (Steiner, 1984).

### **Trasplante e inoculación con microorganismos bioestimulantes**

El trasplante de lechuga orejona se produjo a los 21 días después del trasplante (DDT), con plántulas cuya altura promedio era entre 4 y 6 cm. Estas se extrajeron de las charolas de germinación con ayuda de una navaja, retirándose el Peat Moss sobrante con las manos y enjuando las raíces con agua corriente hasta eliminar todos los residuos de turba. Acto seguido, y con el objetivo de tener una segunda inoculación (reinoculación) con los microorganismos bioestimulantes aplicados en el semillero, se les colocó durante 15 min en vasos de precipitado con los preparados y concentraciones correspondientes.

En seguida, se procedió a envolver los tallos y parte del sistema radicular de las plantas con tiras de polifoam de ca. 1 cm de grosor, las cuales servirían como tutores para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Una vez envueltas, se colocaron dentro de las canastillas para hidroponía, cuidando que los extremos de las raíces

<sup>1</sup> Haifa Group México (2021). Accesado 10 julio 2021. Disponible en: <https://www.haifa-group.com/haifa-mexico>.

<sup>2</sup> Hydro Environment (2021). Accesado 10 julio 2021. Disponible en: <https://hydroenv.com.mx/catalogo>.

sobresalieran hacia abajo para tener contacto con la solución nutritiva.

### **Variables evaluadas**

Las variables evaluadas fueron altura de la planta y número de hojas desde los 7 hasta los 28 DDT, período en el que se estimó: volumen radical, área foliar (mediante el software Adobe® Photoshop® CS6 para Windows 7.0), longitud de raíz, biomasa (fresca y seca) y unidades formadoras de colonias (UFC) de *A. brasilense* con la técnica de Rodríguez (1982) y Döbereiner *et al.* (1995), para concentración de *T. harzianum* (conidios·mL<sup>-1</sup>) se realizó en cámara de Newbauer (microscopio óptico y objetivo de 40X, en una dilución 10<sup>2</sup>, calculándose por la fórmula de Lecuona [1996])<sup>3</sup> y para UFC de *B. subtilis* se utilizó la técnica de Glick *et al.* (1999).

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico en primera instancia se realizaron los contrastes de normalidad correspondientes y, tras comprobar la fiabilidad estadística de los datos obtenidos en este bioensayo, las variables evaluadas fueron analizadas mediante un ANOVA y contraste de

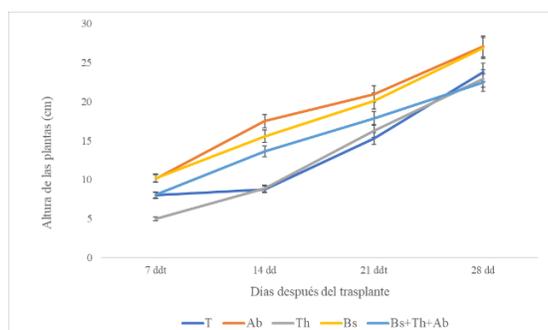
mínima diferencia significativa (HSD) de Tukey, con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha= 0.05$ ) del software STATISTICA versión 10.0 (StatSoft, Inc. 2011) para Windows.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

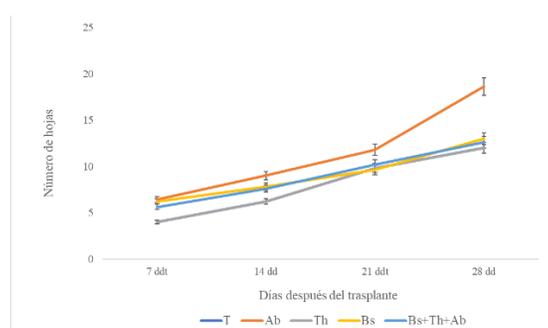
En cuanto a la dinámica de crecimiento de las plantas de lechuga orejona cv. 'Parris Island' en altura de planta (Fig. 1a) y número de hojas (y por ende mayor biomasa con valor agrícola, Fig. 1b) se observa la disposición y comportamiento aventajado en *Ab* desde los 7 hasta los 28 DDT. Esto puede provenir o surgir a partir de la capacidad innata y variabilidad simbiótica de distintas cepas de *A. brasilense* para producir y secretar fitohormonas en la rizosfera, sobre todo ácido-3-indol acético (AIA), el cual es generado en las plantas en cantidades nanomolares pero de vital trascendencia fisiológica (Licea-Herrera *et al.*, 2020) morfológico-radicular (Santos *et al.*, 2021) y asocio con la acumulación de biomasa, tal y como ha sido reportado por Sánchez-Navarrete *et al.* (2021).

---

<sup>3</sup> Concentración (UFC·mL= Número de conidios x 4 x 10<sup>6</sup> x dilución).



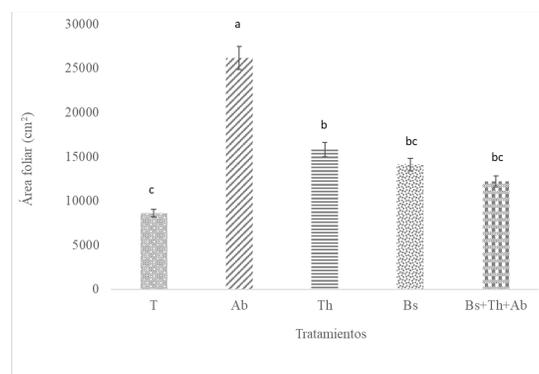
**Figura 1a).** Dinámica de la variable altura de planta de lechuga orejona cv. 'Parris Island' desde los 7 hasta los 28 DDT. Las líneas verticales son el error estándar ( $\pm$ ).



**Figura 1b).** Dinámica para la variable número de hojas en plantas de lechuga orejona cv. 'Parris Island' desde los 7 hasta los 28 DDT. Las líneas verticales son el error estándar ( $\pm$ ).

El ANOVA no solo confirmó lo señalado al revelar diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) e incremento en la altura (*Ab* 13.79 % y *Bs* 13.03 %) y número de hojas (*Ab* 72.22 %) con respecto a las plantas-testigo, sino que el tratamiento *Ab* también mostró sus efectos benéficos en las variables biomasa fresca de follaje (>197 %), área foliar (>203.93 %, Fig. 3) y volumen

radical (>106 %) en comparación con las plantas-testigo (Cuadro 1).



**Figura 3.** Área foliar de plantas de lechuga orejona cv. 'Parris' a los 28 DDT. Columnas con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). Las líneas verticales en las barras son el error estándar ( $\pm$ ).

**Cuadro 1.** Análisis estadístico para las variables altura de la planta, número de hojas, biomasa fresca del follaje y volumen radical a los 28 DDT.

Tratamientos	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Biomasa fresca del follaje (g)	Volumen radical (mL)
T	23.78ab	10.80 b	67.33 c	8.33 b
<i>Ab</i>	27.06 a	18.60 a	200 a	17.16 a
<i>Th</i>	22.96 b	12.0 b	110 bc	8.33 b
<i>Bs</i>	26.88 a	13.0 b	130 b	8.16 b
<i>Bs+Th+Ab</i>	22.44 b	12.60 b	125 b	8.33 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadística significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Los registros obtenidos en el presente bioensayo demuestran que *A. brasilense* fue la rizobacteria cuya adaptación a las condiciones de bajos niveles de oxígeno prevalecientes en este sistema de producción fue superior a la contemplada en la inoculación simple de *T. harzianum* y *B. subtilis* y de *B. subtilis*+*T.*

*harzianum*+*A. brasilense* en consorcio debido, en parte, a que el AIA controla el funcionamiento de diversos procesos que presentan un alto grado de similitud en las vías de síntesis de estas auxinas en plantas y este tipo de microbios diazótrofos (Spaepen *et al.*, 2007; Vega-Celedón *et al.*, 2016).

Adicionalmente, Restrepo-Correa *et al.* (2017) mencionan que se han reportado incrementos manifiestos en brotes (>72 %), área foliar (>50 %) y biomasa vegetal total (>18 %), lo que concuerda con Sangoquiza *et al.* (2019) quienes tras efectuar una investigación con maíz y *Azospirillum* sp. lograron acrecentar la biomasa vegetal al evidenciar valores más altos en la fijación de nitrógeno y consecuente efecto positivo en el desarrollo vegetativo, biomasa seca aérea y radicular de esta Poaceae (Gramineae).

Finalmente, la concentración de las UFC·g<sup>-1</sup> de raíz fresca presentes en cada tratamiento fue de 10 en *Ab*, 12 en *Th*, 5 en *Bs* y 22 en *Bs+Th+Ab*.

### CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se evidencia que bajo las condiciones de manejo e invernadero prevalecientes en este estudio *Azospirillum*

*brasilense* (*Ab*) fue el microorganismo más eficaz para bioestimular la fisiología y morfología radicular de lechuga orejona cv. 'Parris' debido, en cierta medida, a su adaptación a medios con niveles escasos de oxígeno, de modo que se les puede considerar como una alternativa para su utilización en estos sistemas de cultivo hidropónico en raíz flotante.

No obstante, se recomienda continuar con estudios que permitan ampliar la información existente sobre el empleo de estos microbios diazótrofos en los diversos sistemas de bioproductividad en hidroponía.

### BIBLIOGRAFÍA

- Döbereiner, J., Baldani, V. L. D. y Baldani, J. I. (1995). *Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas ñao-leguminosas*. Brasilia, EMBRAPA-SPI.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G. y Penrose, D. M. (1999). *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. Imperial College Press, London, UK.

- Juárez-López, P., Morales-Rodríguez, H. J., Sandoval-Villa, M., Gómez D., A. A., Cruz-Crespo, E., Juárez-Rosete, C. R., Aguirre-Ortega, J. Alejo-Santiago, G. y Ortiz-Catón, M. (2013). Producción de forraje verde hidropónico. *Revista Fuente* (nueva época), 4(13), 16-26.
- Karnoutsos, P., Karagiovanidis, M., Bantis, F., Chatzistathis, T., Koukounaras, A. y Ntinis, G. K. (2021). Controlled root-zone temperature effect on baby leaf vegetables yield and quality in a floating system under mild and extreme weather conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3933-3941.
- Lecuona, R. E. (1996). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Talleres Gráficos Mariano, Buenos Aires, Argentina.
- Licea Herrera, J. I., Quiroz-Velásquez, J. D. C. y Hernández-Mendoza, J. L. (2020). Impacto de *Azospirillum brasilense*, una rizobacteria que estimula la producción del ácido indol-3-acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas. *Revista Boliviana de Química*, 37(1), 3439.
- Pertierra L., R. y Quispe G., J. (2020). *Economic analysys of hydroponic lettuce under floating root system in semi-arid climate*. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida, 31(1), 121-133.
- Restrepo-Correa, S. P., Pineda-Meneses, E. C. y Ríos-Osorio, L. A. (2017). Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: Una revisión sistemática. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 335-351.
- Rodríguez C., E. A. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 990-991.
- Sánchez-Navarrete, E. T., Castañeda-Antonio, M. D., Baez, A. y Morales-García, Y. E. (2021). Rizobacterias para el mejoramiento del cultivo de maíz (*Zea mays*). Una tecnología prometedora para la producción de maíces criollos. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 6(23), 72-92.
- Sangoquiza C., C. A., Yanez G., C. F. y Borges G., M. (2019). Respuesta de la absorción de nitrógeno y

- fósforo de una variedad de maíz al inocular *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens*; Influencia de los biofertilizantes en la extracción de nitrógeno y fosforo. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 11(17), 84-95.
- Santos, M. S., Nogueira, M. A. y Hungria, M. (2021). Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 45: Article ID e0200128. Accesado 27 sep 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20200128>.
- Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N. y Petropoulos, S. A. (2021). Biostimulants application: A low input cropping management tool for sustainable farming of vegetables. *Biomolecules*, 11: Article ID 698. Accesado 28 sep 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/biom11050698>.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10.0. USA: SAS Institute Inc.
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. In: International Society for Soilless Culture (ISOSC) (Ed.). *Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture* (pp. 633-649). ISOSC, Wageningen, The Netherlands.
- Urrestarazu, M. (2015). *Manual práctico del cultivo sin suelo e Hidroponía*. Mundi-Prensa, España.
- Vega-Celedón, P., Canchignia M., H., González, M. y Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias, *Cultivos Tropicales*, 37, 31-37.
- Weather Spark (2021). El tiempo durante todo el año en cualquier parte del mundo. Accesado 26 sep 2021. Disponible en: <https://es.weatherspark.com/>