

Artículo científico**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS ASOCIADAS AL CULTIVO DEL ARROZ (*Oryza sativa* L.).**

Janet Rodríguez Sánchez, Rayza Garbey Coroneaux y Yoania Ríos Rocafull.

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cereal de mayor demanda en el país. Una estrategia favorable para incrementar sus rendimientos es la aplicación de biofertilizantes. Durante los años 2015 y 2016 se aislaron un total de 28 cepas bacterianas asociadas a esta especie. Para ello, se tomaron muestras de suelo rizosférico y plantas de tres cultivares ('INCA LP-5', 'INCA 30-19' y 'Perla de Cuba'), en dos regiones de la provincia Mayabeque. Se emplearon dos tipos de suelos comúnmente utilizados para su cultivo. Para los aislamientos se usaron los medios de cultivo Agar Nutriente, LGI, Ashby y NFB, con el propósito de obtener cepas bacterianas de los géneros *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Azotobacter* y *Azospirillum*. Entre estos géneros existe diversidad de microorganismos endófitos, rizosféricos y asociativos de vida libre. De ellos, siete fueron descartados porque sus características morfológicas y fisiológicas no se correspondieron con ninguno de los cuatro géneros en estudio. Entre las 21 cepas restantes, 20 fijan nitrógeno atmosférico, 11 solubilizan fósforo y 14 producen sideróforos. Se categorizaron dos cepas como *Azotobacter vinelandii*, dos como *Azospirillum brasilense* y 17 de *Bacillus*, lo cual debe confrontarse con técnicas de biología molecular en estudios posteriores. La caracterización del potencial metabólico de estos microorganismos, permitirá avanzar en la evaluación de la estimulación del crecimiento de los mismos, con el fin de seleccionar los más eficientes para formular un bioproducto destinado al beneficio de este cultivo.

Palabras clave: bacterias, *Oryza sativa*, perfil metabólico, PGPR

Isolated, characterization and identification of bacterial strains associated with rice culture.

ABSTRACT

The rice (*Oryza sativa* L.) is the cereal of more demand in the country. A favorable strategy to increase its yields is the biofertilizers application. During the years 2015 and 2016 were isolated a total of twenty-eight bacterial strains associated to this species. For it, they took samples of rhizospheric soils and plants of three cultivars ('INCA LP-5', 'INCA 30-19' and 'Perla de Cuba'), in two regions of the Mayabeque province. Its employed two soils types, commonly used in their culture. For the isolations the culture medium was used (Nutrient Agar, LGI, Ashby y NFB), with the purpose the obtaining of bacterial strains of the genus *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Azotobacter* and *Azospirillum*. Among these genus exists diversity of the microorganism endophytic, rhizospheric and associative of free live. Of them, seven were discarded because their

MSc. Janet Rodríguez Sánchez. Investigador Agregado del Departamento de Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 188 no. 38754 e/ 397 y Linderos. Santiago de Las Vegas, La Habana. Cuba. INIFAT. E-mail: bioferbiocontrol@inifat.co.cu

morphological and physiologic characteristics didn't belong together with none of the four genus in study. Among 21 remaining, twenty fix atmospheric nitrogen, eleven solubilizes phosphorous and fourteen they produce siderophore. Two strains like *Azotobacter vinalandii* were characterized, two as *Azospirillum brasilense* and seventeen of *Bacillus*, although this aspect should be confronted with technical of molecular biology in later studies. The characterization of the metabolic potential of this microorganisms, will allow advancing in the evaluation of the stimulation of the growth of the same ones, with the purpose of selecting the most efficient to formulate a bioproduct dedicated to the benefit of this cultivation.

Key words: bacterial, *Oryza sativa*, profil metabolic, PGPR

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cereal que más se consume en el país, ya que constituye un alimento de vital importancia para el desarrollo, pues es la base alimentaria de toda la población. En el año 2017 solamente se produjeron 255 mil ton de grano, con un rendimiento promedio de 4,14 t.ha⁻¹ (Martínez, 2018).

En el empeño por elevar sus producciones se han diversificado en los últimos años sus tecnologías de cultivo, los tipos de suelos empleados y ha comenzado a jugar un papel decisivo el sector no estatal (Pérez y Penichet, 2014). A pesar de todo el trabajo realizado en distintas regiones, la realidad de la última década ha sido una disminución mantenida y considerable de sus rendimientos. La demanda del grano en cambio, continúa en ascenso y en 2017 alcanzó una cifra de 700 mil ton (Martínez, 2018).

Por ese motivo, el país destina cuantiosos recursos monetarios para la importación de grandes volúmenes de grano. Una de las alternativas que puede contribuir al incremento de sus rendimientos, es la aplicación de biofertilizantes. En este sentido, la caracterización de nuevas cepas bacterianas y la evaluación de su efectividad en interacción con el cultivo son positivas. El presente trabajo se propuso como objetivos aislar y caracterizar cepas bacterianas asociadas al cultivo del arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento de los microorganismos se realizó a partir de muestras de suelo rizosférico y secciones de raíces, tallos y hojas de plantas de arroz. Se emplearon los cultivares 'INCA LP-5'; 'INCA 30-19' y 'Perla de Cuba', procedentes de suelos Hidromórfico Gley Vértico Cálxico Carbonatado y Pardo Sialítico Carbonatado (Hernández *et al.*, 2015) de las localidades de Batabanó y San Nicolás de Bari, usualmente utilizados para este cultivo. Se siguió el Método de las Diluciones Seriadas, para lo que se tomaron 10 g de suelo rizosférico y se disolvieron en 100 mL de agua destilada estéril. Luego, se diluyeron sucesivamente (1/10) y posteriormente se inoculó 0,1 mL de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ en los medios Agar Nutriente (BIOCEN, 2013), Ashby y NFB (Martínez y Dibut, 2012).

Los fragmentos de raíces, tallos y hojas de 1 cm de largo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4 % (Pérez *et al.*, 2014) y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Después se maceraron con un mortero. La savia obtenida se inoculó en los medios Agar Nutriente (BIOCEN, 2013) y LGI (Cavalcante y Döbereiner, 1988 y Ríos *et al.*, 2016). En todos los casos, al presentarse crecimiento microbiano se procedió a la purificación de los microorganismos, para lo que se utilizó el mismo medio de cultivo empleado durante el aislamiento.

Los microorganismos, una vez purificados, se caracterizaron según las referencias de Harrigan y McCance (1968). Se evaluaron caracteres morfológicos y fisiológicos que comprendieron la presencia de las enzimas catalasa y citocromo C oxidasa, la degradación de proteínas (almidón y gelatina), la motilidad, la producción de indol a partir del triptófano, el uso de citrato como fuente de carbono, la fermentación de la glucosa y la lactosa (crecimiento en medio Kligger). Para el caso de los aislados purificados en Agar Nutriente se realizaron dos pruebas adicionales, shock térmico (100 °C de temperatura, durante 15 min) y tinción de esporas.

Al finalizar ese proceso, se descartaron los microorganismos cuyas características no coincidían con los géneros en estudio (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* y *Bacillus*). La propuesta de categorización de las cepas se realizó mediante métodos convencionales. Sus resultados se compararon con las referencias de Holt *et al.* (1994, 2004).

La caracterización del potencial metabólico como bacterias promotoras del crecimiento vegetal se realizó con el uso de las siguientes pruebas:

- ❖ **Fijación biológica de nitrógeno:** se evaluó de forma cualitativa, a partir del crecimiento del microorganismo durante cinco inoculaciones sucesivas en medio Ashby carente de nitrógeno mineral, según la metodología de Pérez *et al.* (2014).
- ❖ **Solubilización de fósforo:** se determinó a partir de la formación de un halo de solubilización en medio Pikovskaya suplementado con fosfato tricálcico (Pikovskaya, 1948; Gayosso *et al.*, 2017).
- ❖ **Solubilización de potasio:** se utilizó una modificación del medio Pikovskaya suplementado con potasio, según el protocolo descrito por Guevara (2010).

- ❖ **Producción de sideróforos:** se usó el medio de cultivo King B (Noh *et al.*, 2014). La evaluación se realizó de forma visual mediante la observación de emisión de fluorescencia por parte de las colonias.

Todos los resultados obtenidos fueron transformados según la escala: positivo: 1 y negativo: 2. Con estos valores se agruparon las cepas de trabajo. El agrupamiento se realizó con el uso de un dendograma por el Método del vecino más cercano. La distancia euclidiana fue fijada al 75 %.

Análisis estadístico de los datos

Se empleó el programa Microsoft Office Excel para calcular el promedio de los valores obtenidos en cada una de las determinaciones, la desviación estándar de la media y para elaborar los gráficos. El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa STATGRAPHICS *Plus* versión 5.0, con el que se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas, según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Cochran C, Hartley y Bartlett. Con este programa se hicieron los análisis de varianza. Cuando existieron diferencias significativas entre los tratamientos, las medias se compararon según la prueba de Duncan al 5% de significación.

Este programa también sirvió para realizar el agrupamiento de los datos de las evaluaciones cualitativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las muestras tomadas de la rizosfera y el interior de las plantas de arroz de los cultivares 'Perla de Cuba', 'INCA 30-19' e 'INCA LP-5', se purificaron 32 microorganismos distribuidos como se muestra en la Figura 1.

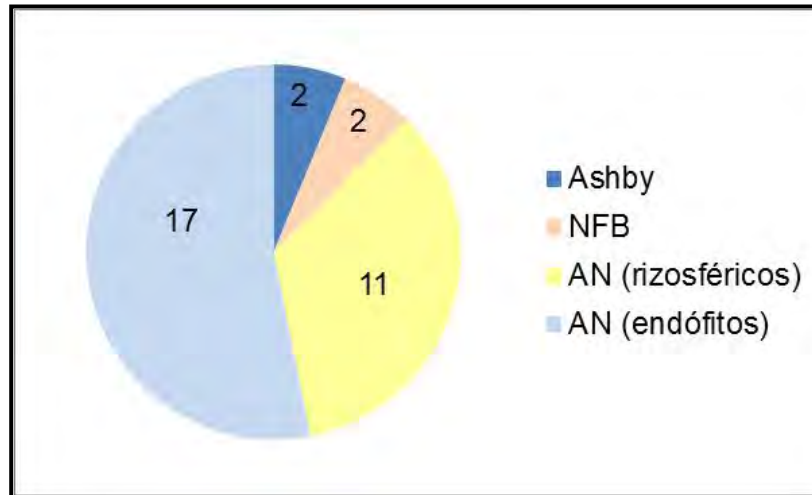


Figura 1. Microorganismos aislados de la rizosfera y el interior de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) agrupados por los medios de cultivo utilizados para su crecimiento.

Sobresale el número de microorganismos crecidos en el medio Agar Nutriente, de donde se purificaron 28 aislados (11 de muestras de la rizosfera y 17 del interior de las plantas). Este es un medio poco selectivo que favorece el crecimiento bacteriano (BIOCEN, 2013), por lo que realiza un mayor aporte inicial de microorganismos en comparación con los medios Ashby y NFB, los que están descritos como selectivos para el aislamiento de *Azotobacter* y *Azospirillum*, respectivamente (Di Bárbaro *et al.*, 2014). En el medio LGI, utilizado para el aislamiento de *Gluconacetobacter* (Cavalcante y Döbereiner, 1988), no se obtuvo crecimiento.

Rouws *et al.* (2010) demostraron la posibilidad de que la bacteria endófito *G. diazotrophicus* colonizara el cultivo del arroz, pero a partir de la aplicación del microorganismo sobre la especie vegetal. Al respecto, las investigaciones señalan varios aspectos que inciden en el aislamiento exitoso de la especie *G. diazotrophicus*, donde se incluyen las dificultades que presenta la bacteria para crecer en condiciones de laboratorio, el estadio fisiológico de la planta, el

método de muestreo utilizado, así como factores abióticos (Ríos y Dibut, 2007; Reis y Dos Santos, 2015 y Restrepo *et al.*, 2017). Cualquiera de estos aspectos pudo intervenir en la no detección de la especie bacteriana.

Los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* se incluyen dentro del grupo de bacterias Gram negativas (Perrig *et al.*, 2007 y Rasulov *et al.*, 2015), mientras que los bacilos son organismos Gram positivos (Kloepper *et al.*, 2017). Basados en esta diferencia, se descartaron cuatro aislados de la rizosfera y siete endófitos, de aquellos crecidos inicialmente en Agar Nutriente, quienes se mostraron como bacilos Gram negativos. Ello reafirmó la poca selectividad del medio Agar Nutriente, pues solo disminuyeron los microorganismos en ese grupo y no en los restantes (Figura 2).

Los resultados obtenidos también demostraron la abundancia de los bacilos como grupo importante de microorganismos del suelo (Mosa *et al.*, 2014), la que se basa en la presencia de la endospora como estructura que le permite resistir

oscilaciones de temperatura, pH, y otros factores estresantes del medio ambiente (Ahemad y

Kibret, 2014 y Odoh, 2017).

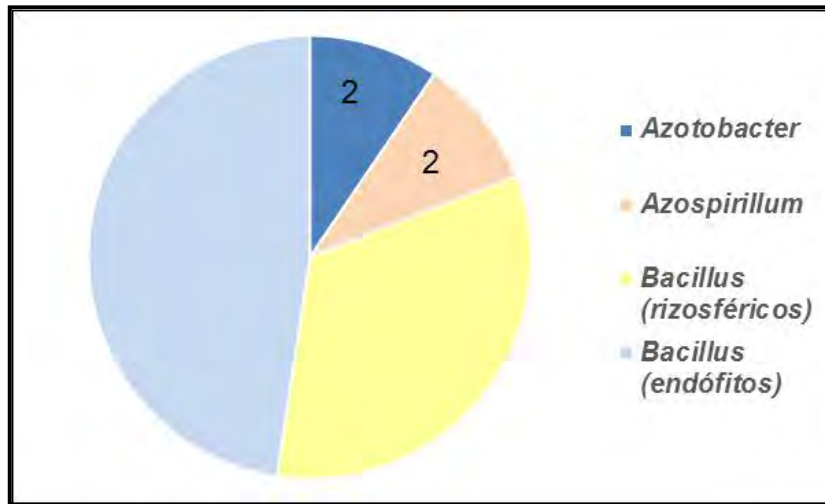


Figura 2. Número de microorganismos aislados del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.), seleccionados después de realizar la tinción de Gram.

En la Tabla 1 se muestran las principales características morfológicas de las colonias que se corresponden con las bacterias en estudio.

Para completar los indicadores que permitieran la selección de los aislados pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, se

realizó una caracterización a partir de la determinación de indicadores fisiológicos (Tabla 2). Para el caso de los microorganismos provenientes de Agar Nutriente, el estudio se completó con la tinción de espora y la prueba de resistencia al shock térmico (Tabla 3).

Tabla 1. Características de las colonias de los microorganismos aislados de muestras de arroz en diferentes medios de cultivo.

| <i>Bacillus rizoeféricos</i> | |
|-------------------------------------|---|
| Agar Nutriente | |
| Ar 5.2 S | Colonia circular, de bordes enteros, elevación plana de color crema y consistencia seca. |
| Ar 6.2 S | Colonia circular de bordes dentados, elevación plana de color crema y consistencia mucosa. |
| Ar 4S | Colonia circular de bordes ondulados e irregulares, elevación plana de color crema y consistencia seca. |
| BR1 | Colonia circular de bordes irregulares, elevación ligeramente levantada con gránulos de color blanco y consistencia seca. |
| AR1 | Colonia circular de bordes enteros, elevación convexa de color beige-blanquecino y consistencia seca. |

Rodríguez et al. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS ASOCIADAS

| | | |
|----------------------------|---|-------------------|
| AR2 | Colonia circular de bordes enteros, elevación convexa de color beige-amarillenta y consistencia mucosa. | |
| AR3 | Colonia irregular de bordes irregulares, elevación plana con gránulos de color blanco y consistencia seca. | |
| Bacillus endófitos | | |
| Agar Nutriente | | |
| BArR 1 | Colonia circular de bordes irregulares, elevación ligeramente levantada de color blanco con gránulos y consistencia seca. | |
| BArR5 | Colonia circular de bordes ondulados, elevación convexa de color amarillo y consistencia seca. | |
| BArH5.2 | Colonia circular, de bordes enteros, elevación convexa de color amarilla y consistencia mucosa. | |
| BArR4 | Colonia circular, de bordes enteros, elevación convexa de color amarillo y consistencia mucosa. | |
| BArH5 | Colonia circular de bordes irregulares, elevación ligeramente levantada de color blanco y consistencia mucosa. | |
| BArT1 | Colonia circular de bordes irregulares, elevación plana con gránulos de color blanco y consistencia seca | |
| BArT4 | Colonia circular de bordes ondulados, elevación plana con apariencia cristalina de color crema blanquecina y consistencia seca. | |
| BArH4 | Colonia circular de bordes enteros, elevación convexa de color blanquecino y consistencia seca. | |
| BArT 5 | Colonia de forma alargada, de bordes irregulares, elevación convexa de color beige y consistencia seca. | |
| BArH5.3 | Colonia de forma irregular, con bordes ondulados, de color crema y consistencia seca. | |
| Azospirillum | | |
| | NFB | Rojo Congo |
| Az 5 | Colonia circular de bordes enteros, elevación convexa de color blanco y consistencia mucosa. | Color rojo |
| Az 6 | Colonia circular de bordes enteros, elevación protuberante de color blanco y consistencia seca. | Color rojo |
| Azotobacter | | |
| Abshy sin nitrógeno | | |
| Ar5 | Colonia circular, de bordes enteros, elevación convexa de color blanco y consistencia mucosa. | |
| Ar6 | Colonia circular de bordes enteros, elevación convexa, translúcida, de color blanco y consistencia mucosa. | |

Tabla 2. Características fisiológicas de los microorganismos aislados de muestras de arroz.

| Cepa | Cat | Ox | Mot | Kliger | Ind | Alm | Gel | Cit |
|-------------------------------------|-----|----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|
| <i>Bacillus rizosféricos</i> | | | | | | | | |
| Ar 5.2 S | + | + | + | - | - | + | + | + |
| Ar 6.2 S | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Ar 4S | + | + | + | - | - | + | - | + |
| BR1 | + | + | + | - | - | + | + | - |
| AR1 | + | + | + | - | - | - | + | + |
| AR2 | - | + | + | - | - | - | + | + |
| AR3 | + | + | + | - | - | + | + | + |
| <i>Bacillus endófitos</i> | | | | | | | | |
| BArR 1 | + | + | + | - | - | + | - | - |
| BArR5 | + | + | + | - | - | + | - | - |
| BArH5.2 | + | + | + | - | - | + | - | + |
| BArR4 | + | + | + | - | - | - | + | + |
| BArH5 | + | + | + | - | - | + | - | + |
| BArT1 | + | + | + | - | - | + | - | - |
| BArT4 | + | + | + | - | - | + | + | + |
| BArH5.3 | + | + | + | - | - | - | - | + |
| BArH4 | + | + | + | - | - | + | + | + |
| BArT 5 | + | + | + | - | - | + | + | + |
| <i>Azospirillum</i> | | | | | | | | |
| Az 5 | + | + | + | - | - | - | - | + |
| Az 6 | + | + | + | - | - | - | - | + |
| <i>Azotobacter</i> | | | | | | | | |
| Ar5 | + | + | + | - | - | - | - | + |
| Ar6 | + | + | + | - | - | - | - | + |

(Cat: presencia de la enzima catalasa; Ox: presencia de la enzima citocromo c oxidasa; Mot: motilidad; Kliger: crecimiento en medio Kliger (fermentación de lactosa y glucosa); Ind: producción de indol a partir del triptófano; Alm: degradación de almidón; Gel: degradación de gelatina; Cit: uso de citrato como fuente de carbono)

A partir de la caracterización realizada se incluyeron los microorganismos codificados como Az5 y Az6 dentro del género *Azospirillum*. Este género presenta las enzimas citocromo oxidasa y

catalasa, además se destaca por su motilidad (Perrig *et al.*, 2007), aunque no hidroliza almidón ni gelatina.

Tabla 3. Resultados de la tinción de esporas y el shock térmico para los microorganismos aislados en el medio Agar Nutriente.

| Microorganismos | Respuesta a la tinción de espora | Shock térmico |
|------------------------------|----------------------------------|---------------|
| Aislados rizosféricos | | |
| Ar 5.2 S | + | + |
| Ar 6.2 S | + | + |
| Ar 4S | + | + |
| BR1 | + | + |
| AR1 | + | + |
| AR2 | + | + |
| AR3 | + | + |
| Aislados endófitos | | |
| BArR 1 | + | + |
| BArR5 | + | + |
| BArH5.2 | + | + |
| BArR4 | + | + |
| BArH5 | + | + |
| BArT1 | + | + |
| BArT4 | + | + |
| BArH5.3 | + | + |
| BArH4 | + | + |
| BArT 5 | + | + |

La especie *A. lipoferum* no crece sin biotina (Pazos *et al.*, 2000), por lo que se descarta su presencia entre los dos aislados purificados en el medio de cultivo selectivo para dicho género bacteriano (NFB).

Del cultivo del arroz han sido aisladas las especies *A. lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense* (Kennedy *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que *A. brasilense* es la única que utiliza el citrato como fuente de carbono, se propone esta especie como ubicación taxonómica para los dos microorganismos aislados en el medio NFB.

El género *Azotobacter*, por su parte, presenta células que pueden ser desde bacilares cortas hasta cocoides, generalmente simples. Es un

microorganismo aeróbico, que fija nitrógeno atmosférico incluso bajo condiciones microaerófilas. Es una bacteria heterótrofa que puede utilizar azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos como fuentes de carbono durante su crecimiento. Incluye a las especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. paspali*, *A. nigricans*, *A. salinestris*, *A. armeniacus* y *A. beijerinckii* (Brenner *et al.*, 2004).

El género *Azotobacter* se destaca, además, por ser mótil y tener ambas enzimas del sistema respiratorio evaluadas en el estudio (catalasa y citocromo oxidasa) (Brenner *et al.*, 2004). Las especies más frecuentes en el cultivo del arroz son *A. chroococcum* y *A. vinelandii* (Kennedy *et al.*, 2004). Estas se diferencian entre sí en la

hidrólisis de almidón, la que es positiva solo para *A. chroococcum*. Este hecho hace pensar que las dos cepas aisladas pertenecen a la especie *A. vinelandii*.

Para el caso de los microorganismos aislados en el medio Agar Nutriente, todos fueron

identificados como *Bacillus*. Los mismos se caracterizaron como bacilos Gram positivos, con endoesporas y móviles, aspectos que coinciden con las referencias de Holt *et al.*, (2004). La identificación propuesta a partir de la caracterización realizada se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Ubicación taxonómica propuesta para los microorganismos aislados del cultivo del arroz.

| Cepa seleccionada | Identificación taxonómica |
|-------------------|--------------------------------|
| Ar 5.2 S | <i>Bacillus</i> sp |
| Ar 6.2 S | <i>Bacillus</i> sp |
| Ar 4S | <i>Bacillus</i> sp |
| BR1 | <i>Bacillus</i> sp |
| AR1 | <i>Bacillus</i> sp |
| AR2 | <i>Bacillus</i> sp |
| AR3 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArR 1 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArR5 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArH5.2 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArR4 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArH5 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArT1 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArT4 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArH5.3 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArH4 | <i>Bacillus</i> sp |
| BArT 5 | <i>Bacillus</i> sp |
| Az 5 | <i>Azospirillum brasilense</i> |
| Az 6 | <i>Azospirillum brasilense</i> |
| Ar5 | <i>Azotobacter vinelandii</i> |
| Ar6 | <i>Azotobacter vinelandii</i> |

Para identificar hasta especie, se recomienda el empleo de herramientas de biología molecular, donde se pueden incorporar métodos como la electroforesis, la tipificación de plásmidos y análisis del genoma completo de la cepa bacteriana (Soto y López, 2012).

La elaboración de bioproductos a partir de cepas autóctonas, pueden presentar diferentes mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en las plantas. Cuando los microorganismos permanecen asociados a la rizosfera o en el interior de las plantas se supone que aumente su acción estimuladora.

Como mecanismo directo de estimulación del crecimiento vegetal se evaluó, para las 21 cepas seleccionadas (Tabla 4), la capacidad de fijación biológica de nitrógeno, a partir de su crecimiento en un medio de cultivo carente de nitrógeno combinado. Al no ser suplementado el nutriente, el microorganismo solo puede crecer a expensas de su transformación, por lo que se infiere que deba haber realizado el proceso de FBN. En este caso, la mayor parte de las cepas presentan resultados positivos, lo que se demostró por el halo de crecimiento formado. Solo mostró un comportamiento contrario la cepa BArH5, quien no creció ni siquiera en la primera inoculación realizada al medio Asbhy.

Los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* se reconocen como microorganismos fijadores de nitrógeno (Oedjijono *et al.*, 2014 y Flores *et al.*, 2017), por lo que parte de sus beneficios se asocian a esta capacidad metabólica. Para el caso del género *Bacillus* también se refiere en la literatura su potencial para llevar a cabo dicho proceso metabólico (Zhao *et al.*, 2016). Estas referencias refuerzan los resultados obtenidos. A partir del cultivo del arroz otros autores han realizado aislamientos de cepas con un alto potencial metabólico para la estimulación del crecimiento que inciden favorablemente sobre el mismo (Rojas *et al.*, 2016 y Flores *et al.*, 2017). Ninguno de los microorganismos solubilizó potasio.

Guevara (2010) obtuvo resultados similares al estudiar una colección de aislados colombianos, pues entre 65 incorporaciones evaluadas solo tres cepas manifestaron resultados positivos para solubilizar este elemento. Se planteó la dificultad para demostrar *in vitro* la solubilización de potasio,

debido a la disponibilidad de fuentes totalmente insolubles que puedan ser aprovechadas por los microorganismos. También se señaló la existencia de múltiples factores que inciden en la interacción suelo-planta-microorganismo, que hacen difícil extrapolar estos resultados a condiciones *in vivo*.

En cuanto a la solubilización del fósforo y la producción de sideróforos por parte de los microorganismos aislados se mostró un comportamiento heterogéneo. En la Figura 3 se observa que 11 de estos microorganismos tienen potencial para solubilizar el fosfato tricálcico añadido al medio de cultivo, mientras que 13 producen compuestos con afinidad por el hierro (sideróforos).

Debe señalarse que estos estudios se hicieron de modo cualitativo, por tanto, los resultados que se muestran, se corresponden con dos grados diferentes de la escala arbitraria empleada. Se utilizaron los valores 0,02 para los negativos y 1 para los positivos.

Desde el punto de vista agrícola la solubilización del fósforo reviste un gran interés, pues este elemento es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, se inmoviliza muy pronto y deja de encontrarse en formas asimilables. Buono y Ulla (2016) y Harinathan *et al.*, (2016) aislaron cepas provenientes de la rizosfera de cultivos de cereales y seleccionaron para estudios futuros, las que poseían entre los mecanismos de estimulación del crecimiento la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas en forma de compuestos indólicos (AIA) y producen sideróforos, lo que denota su importancia.

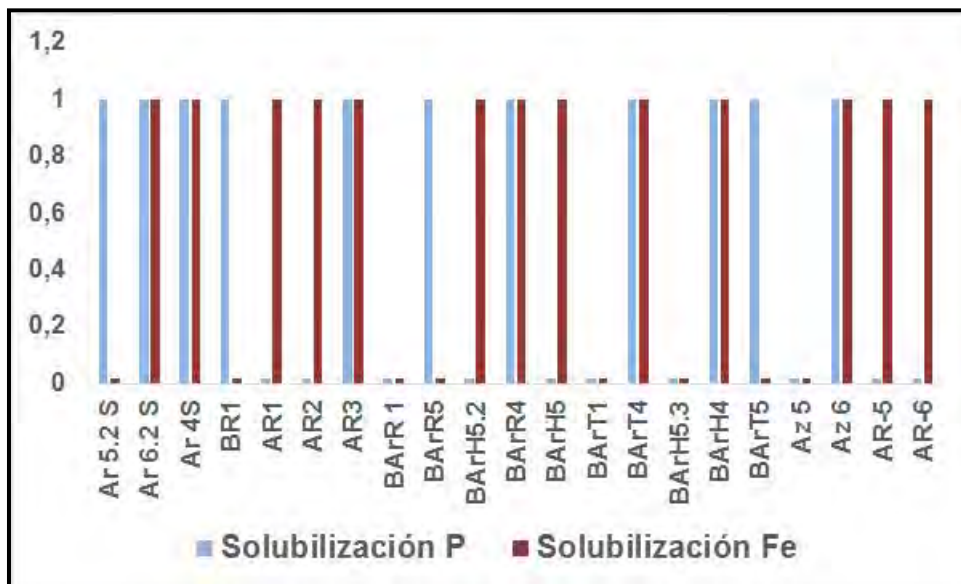


Figura 3. Solubilización de hierro y producción de sideróforos por parte de cepas aisladas del cultivo del arroz.

Los sideróforos, por su parte, son compuestos que tienen la potencialidad de secuestrar el hierro. Estos procesos químicos retienen este compuesto quelado a otras moléculas, lo que lo inhabilita para ser utilizado por microorganismos como los fitopatógenos, que son altamente dependientes del mismo. El trabajo con este grupo de sustancias ha estado dirigido en los últimos años a su identificación. Sin embargo, autores como Tzacv y Poole (2015) y Karnwall (2017) resaltan el papel estimulador del crecimiento que pueden tener estas, al asociarse a la rizosfera de las plantas, ya que contribuyen directamente a mantener una variada comunidad microbiana.

El agrupamiento realizado al otorgar una escala a la respuesta de los microorganismos (positiva 1, negativa 2) permitió conformar cuatro grupos. En el primero de ellos (I) se incluyen los microorganismos que solubilizaron fósforo y fijaron nitrógeno (Ar5.2s, BR-1, BARR-5 y BART-5), en el segundo (II), aquellos que solo fijan nitrógeno (BARR-1, BART-1, BARH5.3 y Az 5),

en el tercero (III) los que presentan los tres mecanismos (Ar6.2s, Ar4s, AR 3, BARR-4, BART-4, BARH-4 y Az 6) y el último (IV) los que fijan nitrógeno y producen sideróforos (AR-1, AR-2, BARH 5.2, BARH-5, Ar 5 y Ar 6) (Figura 4).

Se demuestra nuevamente la diversidad presente en los microorganismos asociados al cultivo del arroz, sobre todo, para el género *Bacillus*, el que tiene representantes en cada uno de los grupos. En este caso, además de las características estimuladoras del crecimiento de los bacilos y la gran cantidad de especies que agrupa, puede haber influido el hecho de que a él pertenecen la mayor parte de las cepas de trabajo. Sobresale por su estabilidad el género *Azotobacter*, el que está concentrado en un solo agrupamiento.

El proceso de caracterización efectuado permite continuar los estudios relacionados con la formulación de un bioproducto para el beneficio del cultivo del arroz.

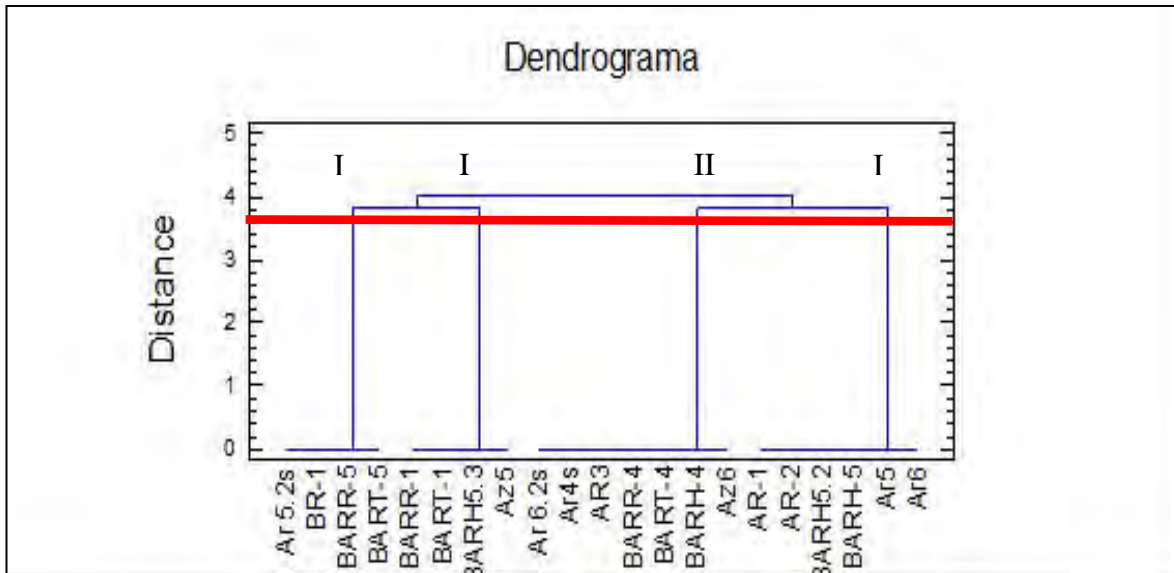


Figura 4. Agrupamiento de las cepas en estudio a partir de los caracteres metabólicos evaluados.

Los resultados demostraron que existen siete cepas (incluidas en el grupo III) que poseen tres vías para estimular el crecimiento de las plantas, lo que posibilita que las mismas incrementen el rendimiento a partir de su aplicación.

La tendencia mundial para la obtención de bioproductos, está basada en el aprovechamiento de las potencialidades de los microorganismos para disminuir las aplicaciones y en la obtención de consorcios microbianos (Bettiol *et al.*, 2014). En América Latina han sido desarrollados algunos paquetes tecnológicos que incluye la aplicación de biofertilizantes con buenos resultados sobre cultivos hortícolas y de granos (Molina *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

- Se aislaron 28 cepas bacterianas asociadas a tres cultivares de arroz, de las cuales 21 fueron categorizadas. Dos pertenecen a la especie *Azotobacter vinelandii*, dos son *Azospirillum brasilense* y diecisiete poseen

características que las ubican dentro de la clase *Bacilli*.

- De ellas, 20 cepas presentan mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal, aspecto favorable para el desarrollo de un producto con efecto biofertilizante. Sobresalen siete, que presentan tres mecanismos de estimulación del crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahemad, M. y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications plant growth promoting rhizobacteria. Current perspective. Journal of King Saud University Science, 26: 1-20. ISSN: 1018-3647. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
- Bettiol, W.; Rivera, M.C.; Mondino, P.; Montealegre, J.R. y Colmenárez, Y.C. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. (Eds.) Bettiol, W.; Rivera, M.C.; Mondino, P.; Montealegre,

- J.R.; Colmenárez, Y.C. 404 pp. ISBN: 978-9974-0-1091-8.
- BIOCEN (2013). Catálogo de Medios de Cultivo. La Habana. Centro Nacional de Biopreparados. Ed. BIOCEN. Mayabeque. 44 pp. Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2015. Disponible en: www.biocen.cu.
- Brenner, D.J.; Krieg, N.R y Staley, J.T. (2004). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. Second Edition. Volume Two.* 379-402 pp. Ed: Microbial Science. England.
- Buono, N.I. y Ulla, E.L. (2016). Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annum* L.) en condiciones controladas. *Revista de Agronomía del Noroeste Argentino*, 36 (2): 45-54. ISSN: 2514-369X.
- Cavalcante, V.A. y Döbereiner, J.A. (1988). A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108: 23-31. ISSN: 0032-079X
- Di Bárbaro, G.; González, B.V. y Batallán, M.S. (2014). *Trichoderma* sp y *Azospirillum* sp. Potenciales agentes de biocontrol de fitopatógenos. *Biología en Agronomía*, 4 (1): 177-189. ISSN: 1853-5216.
- Flores, M.D.J.; Leal, M.G.I.; Ardilla, L.L.D y Cárdenas, C.D.M. (2017). Aislamiento y caracterización de Rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Noroeste de Santander (Colombia). *AgroCiencia*, 51 (4): 373-391. ISSN: 1405-3195.
- Gayosso, B.O.; Rodríguez, H.S.A.; López, B.A. y Luevanos, E.M.P. (2017). Aislamiento e identificación de Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos y su potencial para disolver fosfato tricálcico. *Revista de Investigación y Desarrollo*, 3 (7): 33-37. ISSN: 2444-4987.
- Guevara, M.F. (2010). Aislamiento e identificación de microorganismos solubilizadores de potasio a partir de muestras de suelo y raíces de cultivos de alcachofa de la localidad de la Remonta, Cantón Cayambe. Tesis para obtener el Título de Ingeniera en Biotecnología. Sangolquí, 25 de junio del 2010. 86 pp.
- Harinathan, B.; Sankaralingam, S.; Palpperumal, S.; Kathiresan, D.; Shankar, T y Prabhu, D. (2016). Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on Growth and development of Pearl Millet and Ragi. *Journal of Advances Biology and Biotechnology*, 7 (3): 1-7. ISSN: 2394-1081. DOI: 10.3794/JABB/2016/26290.
- Harrigan, W.F. y McCance, M. (1968). *Métodos de Laboratorio de Microbiología.* (ed). Academia, España. 20 p. Disponible en: IberLibro.com.
- Hernández, J. A., Pérez, J.J.M., Bosch, I.D. y Castro, S.N. (2015). Clasificación de los suelos en Cuba. INCA-IIS. Editorial: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). pp 93. ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J. y Williams, S. (1994). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Ten Edition. (1nd). 878-925 pp. Ed: Microbial Sciences. England.
- Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J. y Williams, S. (2004). "The genus *Bacillus*". In: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Ten edition (2nd). 751-778 pp. Ed: Microbial Sciences. England.
- Karnwall, A. (2017). Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere and their plant growth promoting effect on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Protection Research*. 57 (2): 144-151. ISSN: 1427-4345. DOI: 10.1515/jppr-2017-0020.
- Kennedy, I.R.; Choundhury, A.T.M.A. y Kecskés, M.L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming system: can their

- potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1229-1244. ISSN: 0038-0717. DOI: 10.1016/j.soilbio.
- Kloepper, J. W.; Liu, K.; Newman, M.; McInroy, J. A, y Chia-Hui, H. (2017). Selection and assessment of PGPR for biological control of multiple plant diseases. *Phytopathology*, XXXX-XXX:X – X. DOI: 10.1094/PHYTO-02-17-0051-R.
- Martínez, M.J. (2018). La producción de arroz en Cuba. *Periódico Granma. Órgano Oficial del Comité Central del Partido Comunista de Cuba*. 26 de marzo de 2018. Página 1. Fecha de consulta: 5 de septiembre de 2018. Disponible en: www.granma.cu.
- Martínez, R. y Dibut, B. (2012). *Biofertilizantes Bacterianos*. Editorial Científico-Técnica. ISBN 978-959-05-0659-8. 279 pp.
- Molina, R.D.; Bustillos, C.M.R.; Rodríguez, A.O.; Morales, G.Y.E.; Santiago, S.Y.; Castañeda, L.M. y Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17 (2): 24-34. ISSN: 2007-8145.
- Mosa, W.F.A.E-G.; Paszt, L.S y El-Megged, N.A.A. (2014). The role of Biofertilization in improving Fruits Productivity. A review. *Advances in Microbiology*, 4: 1057-1064. ISSN: 2165-3410.
- Noh, M.J.; Yan, CH.C.; Borges, G.L.; Zúñiga, A.J.J y Godoy, H.G. (2014). Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana*, 32 (4): 273-281. ISSN: 0187-5779.
- Odoh, CH.K. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Bioprotectant bio inoculant for Sustainable Agrobiolgy. A review. *International Journal of Advance Research in Biological Sciences*, 4 (5): 123-142. ISSN: 2348-8069. DOI: 10.22192/ijarbs.
- Oedjijono, O. D.; Sutariningsih, S.E.; Moeljopawro, S.y Adi, D.H. (2014). Promising plant growth promoting rhizobacteria of *Azospirillum* spp isolated from iron sand soils, Purworejo coast central Java. Indonesia. *Advances in Applied Science Research*, 5 (3): 302-308. ISSN: 0976-8610.
- Pazos, M.; Hernández, A.; Paneque, M. y Santander, J.L. (2000). Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. *Cultivos Tropicales*, 21 (3): 19-23. ISSN: 1819-4087.
- Pérez, C.A.; Tuberquia, S.A y Amell, J.D. (2014). Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agronomía Mesoamericana*, 25 (2): 213-225. ISSN: 2215-3608. DOI: 10.15517/amv/252.15425.
- Pérez, P.M. y Penichet, C.M.A. (2014). Los rendimientos arroceros en Cuba: propuesta de un sistema de acciones. *Economía y Desarrollo*, 152 (2): 138-154. ISSN: 0252-8584.
- Perrig, D.; Boiero, M. L.; Masciarelli, O. A.; Penna, C.; Ruiz, O. A.; Cassán, F. D y Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. ISSN: 1432-0614. DOI: 10.1007/s00253-007-0909-9.
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorous in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17: 362-370. ISSN: 0026-3656.
- Rasulov, B.A.; Yilí, A. y Aisa, H.A. (2015). Removal of Silver from aqueous solution by *Azotobacter chroococcum* XU 1 Biomass and exopolysaccharide. *Advances in Microbiology*,

- 5: 198-203. ISSN: 2165-3402 A. DOI: 10.4236/aim.2015.53019.
- Reis, M.V. y Dos Santos, T.K.R. (2015). Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agricultural. Journal of Basic Microbiology, 54:1-19 ISSN: 1521-4028 DOI: 10.1002/jobm.201400696.
- Restrepo, M.B.; Sánchez, O.J.; Marulanda, S.M.; Galeano, N.F. y Taborda, G. (2017). Evaluation of plant growth promoting properties of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Gluconacetobacter sacchari* isolated from sugarcane and tomato in West Central region in Colombia. African Journal of Biotechnology, 16 (30): 1619-1629. ISSN: 1684-5315. DOI: 10.5897/AJB2017.16016.
- Ríos, R.Y. y Dibut, A.B. (2007). *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Un microorganismo promisorio en la elaboración de biopreparados. Cultivos Tropicales, 28 (4): 19-24. ISSN: 1819-4087.
- Ríos, R.Y.; Rojas, B.M.; Ortega, G.M.; Dibut, A.B y Rodríguez, S.J. (2016). Aislamiento y caracterización de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Cultivos Tropicales, 37 (1): 34-39. ISSN: 1819-4067.
- Rojas, B.M.; Tejera, B.; Bosh, D.M.; Rios, R.Y.; Rodríguez, S.J. y Heydrich, M. (2016). Potencialidades de cepas de *Bacillus* para la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.). Cuban Journal of Agricultural Science, 50 (3): 485-496. ISSN: 0864-0408
- Rouws, L.F.M.; Meneses, C.H.S.G.; Guedes, H.V.; Vidal, M.S.; Baldani, J.I. y Schwab, S. (2010). Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. Letters in Applied Microbiology, 51: 325-330. ISSN: 0266-8254.
- Soto, S.J.C. y López, C.C.E. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. Fitosanidad, 16 (2): 101-113. ISSN: 1562-3009.
- Tkacz, A. y Poole, P. (2015). Role of root microbiota in plant productivity. Journal of Experimental Botany, 68 (8): 2167-2175. ISSN: 1460-2431. DOI: 10.1093/xb/arv157.
- Zhao, Q.; Mei, X. y Xu, Y. (2016). Isolation and identification of antifungal compounds produced by *Bacillus* Y-IVI for suppressing *Fusarium* wilt of muskmelon. Plant Protection Science, 52 (3): 167-175. ISSN: 1805-9341. DOI: 10.17221/70/2015-PPS.

Fecha de recepción: 10 mayo 2019

Fecha de aceptación: 2 noviembre 2019

Agrotecnia de Cuba
ISSN impresa: 0568-3114
ISSN digital: 2414- 4673
<http://www.ausuc.co.cu>

