

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL EN LA ELABORACIÓN DE INOCULANTES MICROBIANOS

Marisel Ortega García, Yoania Ríos Rocafull, Ignacio Caraballo Barreto y Bernardo Dibut Álvarez

RESUMEN

Por la gran diversidad de microorganismos existente en el suelo y en la búsqueda de variabilidad de aislados con potencialidades de uso agrícola, se tomaron muestras de diferentes agrupamientos de suelos en ecosistemas con características especiales. Se purificaron 19 aislados, de los que se seleccionaron cuatro por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y uno que solubiliza fósforo inorgánico. Los mismos se incluyeron dentro de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus*, respectivamente, teniendo en cuenta los resultados de 20 pruebas realizadas para su caracterización. El aislado A-19 se destacó por su acción estimuladora sobre el crecimiento del tomate (*Solanum lycopersicum*, L) y el A-32 para el caso de la lechuga (*Lactuca sativa*, L), mientras que el B-3 mostró buenos resultados en asociación con ambas especies vegetales. Teniendo en cuenta este comportamiento se incluyeron todos los aislados en la Colección de Bacterias Beneficiosas del INIFAT, por sus posibilidades de uso para la elaboración de inoculantes microbianos.

Palabras claves: diversidad, caracterización, colección

Isolation and selection of microorganism with potential for bioproduct elaboration

ABSTRACT

Due to big diversity of microorganism of soil and to search variability in strains with potential for agriculture were take samples of different group of soils in ecosystem with special characteristic. Were purified 19 strains and were selected four for its capacity to fix atmospheric nitrogen and one by the potential for inorganic phosphorus solubilization. They were including inside *Azotobacter* and *Bacillus* genus, respectively, by the results of 20 test of characterization. The strain A-19 was select by its stimulator action over tomato (*Solanum lycopersicum*, L) and the A-32 for lettuce (*Lactuca sativa*, L). The B-3 strain showed good results in association with both vegetables species. Due to the results all the strain were incorporated on Beneficial Bacteria Collection of INIFAT by its possibilities for bioproducto elaboration.

Key words: diversity, characterization, collection

Ing. Marisel Ortega García, Especialista del Grupo de Agrobiotecnología del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT)

✉ biofersuelos@inifat.co.cu

INTRODUCCIÓN

El suelo es la base fundamental para alcanzar la sostenibilidad alimentaria, no obstante, contradictoriamente, es el recurso más expuesto y frágil en cuanto a todos los procesos por los que tiene que transitar y que provocan su degradación. El mismo no es un medio inerte, sino que es totalmente dinámico y vivo y tanto su desarrollo como actividad dependen de los factores de formación, así como la acción que ejercen los microorganismos predominantes (Raaijmakers *et al.*, 2009). El manejo que se realice va a tener un efecto negativo o positivo en cuanto a su dinámica interna y productividad.

Es por ello que las prácticas utilizadas deben crear las condiciones adecuadas para mejorar su dinámica biogeoquímica e incrementar su capacidad productiva en el tiempo. En este sentido, las técnicas a ser aplicadas deben permitir alcanzar objetivos económicos, sociales y ambientales (Batista, 2009).

El aislamiento de nuevos microorganismos con posibilidades de ser utilizados como biofertilizantes para la agricultura, constituye hoy día una práctica necesaria e imprescindible (Alexander, 1980). Sus características dependen de los factores ambientales existentes en cada habitat, por lo que la diversidad de géneros obedece a aspectos como la temperatura, pH, aireación y prácticas agrícolas inadecuadas, que favorecen o disminuyen su multiplicación (Adoutrar *et al.*, 2007). Seleccionar cepas con mayor potencial de uso y adaptabilidad para diferentes tipos de cultivos y suelos, resulta una estrategia forzosa para el mundo actual, que permitirá contar con aislados previamente seleccionados que se multipliquen adecuadamente, minimizando el daño a la microbiota en cada ecosistema, como premisa para obtener mejores resultados desde el punto de vista agroproductivo (Chiarucci *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la toma de 50 muestras de distintos tipos de agrupamientos de suelos en el Escambray Cienfueguero, Quivicán y Candelaria, se utilizaron 10 g, los que se suspendieron en 100 ml de agua destilada estéril. La solución obtenida se inoculó sobre placas Petri de 9 cm con medio Agar Nutriente,

las que se incubaron durante 48 horas entre 28-30°C de temperatura. Las colonias morfológicamente diferentes fueron transferidas a medio Asbhy carente de Nitrógeno y a Pikovskaya (citados por Martínez *et al.*, 2007), y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de crecimiento referidas anteriormente, purificándose sólo aquellas con resultados positivos.

A este grupo de aislados se les realizó una caracterización morfológica (caracteres culturales, Tinción de Gram, presencia de cápsula y de esporas), fisiológica-bioquímica (Harrigan y Mc Cance, 1968) (oxidasa, catalasa, motilidad, Kliger, Vogues Proskauer, Rojo de metilo, caseína, almidón, citrato, gelatina e indol y utilización de azúcares (Manitol, Lactosa, Dextrosa, Glucosa, Sacarosa y Fructosa), la que sirvió de base para proponer una ubicación taxonómica, según las referencias del Manual de Sistemática para Bacterias (Bergey) en las ediciones 1994 y 2004.

Para la determinación del potencial estimulador del crecimiento “*in vivo*” se utilizó el Método de Bioensayo (Screening) en bandejas de 25 cm² con un suelo Ferralítico Rojo, previamente esterilizado en autoclave a 121°C y 1,5 atmósferas, durante una hora, por tres días. Los productos de cada microorganismo se obtuvieron en condiciones de zaranda rotatoria a 200 r.p.m de agitación, 32°C de temperatura, durante 48 horas (Martínez *et al.*, 2006) alcanzándose una concentración de 10¹¹ UFC.mL⁻¹ en todos los casos. Como medio de cultivo para la reproducción se utilizó el Dimargón-M (Dibut *et al.*, 2003).

Se seleccionaron los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad INIFAT-28 y lechuga (*Lactuca sativa*) variedad GR-30. La evaluación se efectuó a los 21 días de sembrados en ambos casos, y se determinaron como indicadores del crecimiento el largo de la raíz (cm), altura de la planta (cm), número de hojas, diámetro del tallo (cm), largo por ancho de la hoja principal (cm²) y peso fresco (g). La aplicación de los productos se realizó en el momento de la siembra a razón de 25 mL disueltos por bandeja.

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente según ANOVA con prueba Duncan mediante el programa STAGRAPH versión 4.0. Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del muestreo inicial de suelo se purificaron 19 aislados morfológicamente diferentes, según su patrón de crecimiento en medio Agar Nutriente. Al transferir los mismos a los medios Asbhy y Pikoskaya solamente cinco mostraron posibilidades de uso como fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo *in vitro* (Tabla.1).

como Bacilos cortos Gram negativos no esporulados con presencia de cápsula. Estas características coinciden con las que presenta el género *Azotobacter* (Holt *et al.*, 1994). Por su parte, el B-3 forma en medio Agar Nutriente colonias irregulares, planas, con gránulos en su interior, bordes irregulares, siendo, desde el punto de vista micro-morfológico un bacilo largo Gram Positivo, esporulado, con cápsula, caracteres consistentes con el género *Bacillus* (Holt *et al.*, 1994, 2004).

Tabla 1. Microorganismos seleccionados por la capacidad metabólica según criterio de discriminación utilizado

Código	Procedencia y Agrupamientos	Criterio de selección		
		Capacidad FBN (Diámetro colonia)	Halo de solubilización	
			NBRIP	PK
A-19	Cienfuegos, Pardo,	0,49	-	-
A-31	Candelaria, Fersialítico,	0,48	-	-
A-32	Cienfuegos, Pardo,	0,52	-	-
A-33	Quivicán, Ferralítico	0,45	-	-
B- 3	Cienfuegos, Pardo,	-	0,35	0,55

En la Tabla 1 se aprecia el potencial en cuanto a Fijación Biológica de Nitrógeno de los aislados en la que se destaca el A-32 por presentar un mayor diámetro de la colonia en medio Asbhy en ausencia de nitrógeno. En cuanto a la capacidad de solubilizar fosforo se observa que el aislado B-3 presenta un mayor halo de solubilización en medio NBRIP lo que puede deberse a que utilice como mecanismo fundamental para llevar a cabo el proceso la producción de ácidos orgánicos que tributan al viraje del indicador que se adiciona al medio de cultivo (Rojas, 2012). Esta acción puede estar potenciada por otros mecanismos biológicos de los microorganismos que permiten se rompan los enlaces moleculares, como la presencia de enzimas fosfatasas (Biu *et al.*, 2009).

Los microorganismos A-19, A-31, A-32 y A-33 presentan colonias de forma circular, elevación convexa, bordes enteros y traslucidas en medio Asbhy. A excepción de la A-33 todos pigmentan con la edad tornándose beige. Las mismas se comportan además

En las Tablas 2 y 3 se demuestra, mediante la caracterización fisiológica-bioquímica realizada, la diversidad de comportamientos de los microorganismos, lo que denota una variabilidad metabólica en el uso de fuentes de carbono. Ello le confiere mayor riqueza, ya que permite sean utilizados como estrategia en diferentes ecosistemas y a su vez para la elaboración de inoculantes a escala industrial, de acuerdo a las posibilidades de adquisición de reactivos específicos para su crecimiento y desarrollo.

La comparación de estos resultados y la descripción referida en el Manual de Sistemática para bacterias Bergey's (Holt *et al.*, 1994 y 2004), permiten ubicar de forma tentativa a los microorganismos denominados A-31 y A-32 dentro de la especie *Azotobacter chroococcum* y A-19 y A-33 como *A. vinelandii*. En cuanto al aislado B-3 las pruebas realizadas lo permiten insertar dentro de la especie *Bacillus megatherium*. No obstante, se recomienda realizar estudios de biología molecular para ratificar los resultados obtenidos.

Tabla 2. Caracterización fisiológico-bioquímica de los aislados

No	Ox	Cat	Mot	kliger	VP	RM	Cas	Alm	Cit	Gel	Ind
A-19	+	+	+	-	-	-	0,15	0,5	+	0,9	-
A-31	+	+	+	-	-	-	0,3	1,0	+	-	-
A-32	+	+	+	-	-	-	0,3	1,0	+	-	-
A-33	+	+	+	-	-	-	0,6	0,2	+	0,7	-
B-3	+	+	+	-	-	-	0,15	1,4	+	1,1	-

Ox (oxidasa), Cat (catalasa), Mot (motilidad), Kliger (Kliger), VP (Vogues Proskauer), RM (Rojo de metilo), Cas (caseína) Alm (almidón), Cit (citrato), Gel (gelatina) e Ind (indol)

Tabla 3. Fermentación de azúcares

No	Man	Lact	Dex	Glu	Sac	Fruct
A-19	+	+	+	+	+	-
A-31	+	+	B	+	+	-
A-32	+	+	B	+	+	-
A-33	+	+	+	+	+	-
B-3	+	+	+	+	+	+

B: reacción básica. El medio se colorea de rojo intenso-rosado en vez de amarillo

Man (Manitol), Lact (Lactosa), Dex (Dextrosa), Glu (Glucosa), Sac (Sacarosa) y Fruct (Fructosa)

En cuanto a la capacidad de estimular el crecimiento de los cultivos se destacan los aislados A-19 y B-3, para el caso del tomate (*Solanum lycopersicum* L) (Tabla 4), ya que producto de la inoculación microbiana las plántulas presentan mayor peso fresco y largo por ancho de la hoja principal, lo que demuestra su potencialidad en cuanto a estimulación del crecimiento vegetal (Mehrvarz *et al.*, 2008). No obstante, los otros aislados tienen buena respuesta como estimuladores del crecimiento.

Contar con una variabilidad de cepas para los diferentes ecosistemas constituye una estrategia atractiva para llevar a la práctica agrícola por las implicaciones que esto puede traer, sobre todo por concepto de no adicionar modificaciones a la microbiota existente, para evitar agresiones al medio ambiente y a su vez cumplir con la demanda en materia de biofertilizantes que necesita nuestra agricultura (Martínez *et al.*, 2007).

Tabla 4. Efecto de la inoculación con diferentes aislados en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), variedad INIFAT-28

Variantes	Número hojas	Altura planta (cm)	Diámetro (cm)	Peso fresco (g)	Largo / ancho
A-19	4,8 ab	23,05 a	0,34 a	5,42 a	121,05 ab
A-31	4,57 abc	18,98 bc	0,34 a	4,18 ab	63,82 c
A-32	4,38 bc	17,60 c	0,30 ab	2,78 b	76,40 bc
A-33	4,62 abc	18,81 c	0,29 ab	2,80 b	69,32 c
B-3	5,0 a	22,36 ab	0,36 a	5,28 a	123,98 a
Testigo	4,0 c	20,32 abc	0,27 b	3,10 b	99,85 abc
ESX	0,210	1,173	0,028	0,540	15,00
CV (%)	12,52	15,90	24,33	42,80	44,66

Tabla 5. Efecto de la inoculación con diferentes aislados en el cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa*) variedad GR-30

Variantes	Numero hojas	Altura planta (cm)	Diámetro (cm)	Peso fresco (g)	Largo/ ancho
A-19	5,60 b	13,82 bc	0,30 de	3,9 abc	90,10 abc
A-31	5,33 b	17,45 a	0,40 ab	3,78 bc	102,958 ab
A-32	5,50 b	15,88 ab	0,35 bcd	4,4 ab	85,16 abcd
A-33	5,28 b	15,17 b	0,33 cd	3,41bc	77,48 cd
B-3	7,20 a	17,68 a	0,46 a	5,4 a	111,602 a
Testigo	5,33 b	12,25 c	0,25 e	2,75 c	58,06 d
DSE	0,943	2,225	0,079	1,295	25,67
ESX	0,355	0,638	0,033	0,503	9,529
CV (%)	16,40	14,66	22,78	33,78	29,47

Para el caso de la lechuga (*Lactuca sativa* L) se destacan los aislados A-19, A-31 y B-3, aunque los otros muestran posibilidades de ser incluidos en otros estudios, pues los resultados no son despreciables (Tabla 5). Ello permite que los cinco microorganismos en estudio se incluyan para ser utilizadas en distintos tipos de suelos y cultivos, como estrategia de manejo, en especies de importancia agrícola (Martínez *et al.*, 2007).

Mediante los resultados obtenidos, se observa que todos los aislados presentan buenas cualidades metabólicas para inducir un aumento en la estimulación del crecimiento, una vez asociados a los cultivos seleccionados para cada uno de ellos. A su vez contar con nuevos microorganismos que nos permitan realizar un manejo conveniente de la nutrición para cada especie vegetal en estudio, y con posibilidades de ser utilizados en la fabricación de biofertilizantes para la agricultura moderna (Gholami, 2009).

CONCLUSIONES

Se purificaron cuatro aislados de *Azotobacter* y uno de *Bacillus* con potencial para la elaboración de biofertilizantes, destacándose el A-32 por su capacidad de fijación de Nitrógeno y el B-3 por su potencial solubilizador de fosforo inorgánico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adoudrar W., Schwartz C., Benizr E., Morel J., Bolarbah A (2007): Soil microbial diversity as affected by the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* under natural conditions. *International Journal of Phytoremediation*, 9:41-52.
- Alexander, M. (1980). Introducción a la Microbiología del suelo. AGT. Editor S.A. México. ISBN 968-462-002.
- Batista R., Tacoronte J., Sánchez A., Acosta S., Laurreiro R. M., Martínez A.L., (2009): Ecología de comunidades microbianas autóctonas de suelos de serpentina de Moa, Holguín, Cuba. *Anais do III Congresso latino Americano de Ecologia, Sao Lourenço-MG*.
- Biu, H; Hsiung, E.H, Kwok, T.H and Ting, W, H (2009): Microorganisms, microbial phosphate fertilizers and methods for preparing such microbial phosphate fertilizers. Patente No WO2009070966 (A1).
- Chiarucci A., Baker A. (2007): Advances in the ecology of serpentine soils. *Plant Soil*, 293: 1-2.
- Dibut, B., Martínez. R., Ríos. Y y Ortega, M. (2003). DIMARGON-M, nueva variante nutritiva para la producción de biofertilizantes y bioestimuladores a base de *Azotobacter*. En: Resúmenes del V Encuentro de Agricultura Orgánica, La Habana, 36pp.
- Gholami, A., Shahsavani, S y Nezarat, S. (2009). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of Maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 49.19-24.
- Holt, J.G., N.R. Krieg., P.H.A.Sneath., J.T.Staley y S.T.Williams. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition.

- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J y Williams, S. (2004). "The genus *Bacillus*". In: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Ten editions (2nd). 751-778 pp.
- Martínez Viera, R., B. Dibut, G. Tejeda, R. García, J. Rodríguez (2006): Conocimiento general sobre biofertilizantes y bioestimuladores microbianos. Ministerio de Agricultura y Tierras, Caracas, CD.
- Martínez, R., M, López., B, Dibut., C, Parra y J, Rodríguez. (2007). La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Venezuela. MPPAT. 172 pp. Ver 2006.
- Mehrvarz, S., Chaichi, M.R y Alikhani, H.A. (2008). Effects of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Phosphorus Chemical Fertilizer on Yield and Yield Components of Barely (*Hordeum vulgare* L.). American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 3 (6): 822-828.
- Raaijmakers JM, Paulitz CT, Steinberg C, Alabouvette C y Moëgne-Loccoz Y (2009): The rhizosphere: aplayground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil DOI: 12.1007/S11104-008-9568-6.
- Rojas, M., B. Tejera., D. Bosh., Y. Ríos., M. Ortega., D. Lugo y M. Heydrich. (2012). Potencialidades del género *Bacillus* como promotor del crecimiento en los cultivos del arroz y el maíz. Trópico 2012", con ISBN: 978. 959. 982. 979. 1.

Recibido: 3 de septiembre de 2013

Aceptado: 7 de enero de 2014