

EFFECTO DE PLAGUICIDAS QUÍMICOS FRENTE A MICROORGANISMOS DE INTERÉS AGRÍCOLA

Yoania Ríos Rocafull¹, Janet Rodríguez Sánchez¹, Marisel Ortega García¹, Marlene Veitía Rubio², Rigel Fernández Valles², Luis Fey Govín¹, Bernardo Dibut Álvarez¹ y Kattia Cañizares Hernández¹

RESUMEN

La incorporación de los biofertilizantes en conjunto con plaguicidas químicos constituye un reto para Cuba y el mundo. Con el objetivo de potenciar investigaciones de este tipo se determinó, mediante un estudio realizado en condiciones “*in vitro*” mediante el método de Difusión Zonal en Placas, que las sustancias clotanidin, imidacloprid y la mezcla de ésta con tiocarb, permiten el crecimiento en el medio Mueller Hinton de cepas de *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* y *Bacillus*. La sustancia fludioxonil y las mezclas tiametoxan, fludioxonil/mefenoxan y difenoconazol e imidacloprid y tebuconazol (productos Celest, Celest Top, Apron Star y Yunta) muestran efectos inhibitorios moderados, mientras que el thiram y su mezcla con imidacloprid y pencycuron (productos Gaucho MT y TMTD), sobresalen por su toxicidad. Las cepas de *Rhizobium*, *Azotobacter*, *B.megatherium* y *B.subtilis* se adhieren a las semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) peletizadas con los plaguicidas más agresivos, en órdenes que oscilan entre las 10⁶ y 10⁹ UFCxsemilla⁻¹, sin diferencias marcadas con las sustancias Poncho, Gaucho FS, Celest y Celest Top, el oxiclورو de cobre y *Trichoderma harzianum*. Este resultado, y el hecho de no presentar estos tratamientos sobre semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) diferencias significativas al ser inoculadas las mismas con *Rhizobium* en condiciones de casa de cristal, indican la posibilidad de combinar microorganismos de interés agrícola y plaguicidas en un manejo integral de los cultivos. No obstante, se debe prestar atención a los productos Poncho y Celest Top, que afectaron la nodulación del cultivo, en un nivel similar al oxiclورو de cobre.

Palabras claves: biofertilizantes, compatibilidad, productos químicos

Effect of control pest against microorganism with agriculture potential

ABSTRACT

The use of biofertilizers with control pest is a challenge for Cuba and the world. With the aim of improving this kind of research, was determined the no toxic effect over bacteria growth of active substances clotanidin, imidacloprid and its mixed with tiocarb, against *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* and *Bacillus* strains under *in vitro* conditions. This was determined by Zonal Box Diffusion Method. The substance fludioxonil and the combination tiametoxan, fludioxonil/mefenoxan and difenoconazo,

M.Sc Yoania Ríos Rocafull, Investigador Auxiliar del Grupo de Agrobiotecnología del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”. INIFAT

²Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, INISAV

✉ dpagrobiotec@inifat.co.cu

imidacloprid and tebuconazol (Celest, Celest Top, Apron Star and Yunta) had moderated inhibitory effect. Thiram and its join with imidacloprid and pencycuron (Gaucho MT y TMTD) have a high toxicity. In spite of *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus megatherium* and *Bacillus subtilis* strains are present in black bean (*Phaseolus vulgaris*) with the most aggressive product between 10^6 and 10^9 UFCxseed⁻¹ without difference with Poncho, Gaucho FS, Celest y Celest Top, cupper and *Trichoderma harzianum*. This result and the same behavior in greenhouse condition of black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed with these products and *Rhizobium* showed the possibility to combine biofertilizers and control pest for the integral management of crops. Special attention deserves Poncho and Celest Top, due to the damage make in nodulation of black bean. It was similar to cupper.

Key words: biofertilizer, compatibility, chemical product

INTRODUCCIÓN

En el suelo existe una notable diversidad microbiana capaz de realizar disímiles funciones que en su conjunto contribuyen a un mejor desarrollo de los cultivos (Beneduzi *et al.*, 2008). Su explotación ha dado origen a los biofertilizantes, inoculantes elaborados a partir de cepas seleccionadas de microorganismos simbióticos, endófitos o rizosféricos, que con su aplicación en los sistemas agrícolas incrementan la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Martínez *et al.*, 2007).

Dentro de las bacterias que tienen potencial para utilizarse con estos fines se encuentran los géneros *Azotobacter* (Martínez *et al.*, 2007), *Bacillus* (Afzal y Bano, 2008), *Gluconacetobacter* (Saravanan *et al.*, 2008) y *Rhizobium* (Yang *et al.*, 2010). Algunos de ellos han constituido la base de productos comerciales en distintos países, incluyendo Cuba (Martínez *et al.*, 2007).

A pesar de los avances alcanzados con su incorporación en un manejo sostenible de la nutrición vegetal, su inserción en sistemas donde además se incluya la aplicación de plaguicidas químicos y/o biológicos se encuentra aún poco explotada. Con el objetivo de potenciar investigaciones de este tipo, se determinó la posibilidad de combinar plaguicidas químicos aplicados a la semilla y microorganismos de interés agrícola. La evaluación del grado de compatibilidad existente entre ocho especies bacterianas con potencial para la elaboración de biofertilizantes y nueve plaguicidas químicos con actividad fungicida y/o insecticida en condiciones “*in vitro*”, demostró que la mayoría de los productos químicos son compatibles con los microorganismos.

La cuantificación de la población bacteriana en la superficie de semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) peletizadas con seis de ellos, comparados con el oxiclورو de cobre y un control biológico y la valoración del crecimiento de estas semillas peletizadas y biofertilizadas con *Rhizobium* en condiciones semi-controladas, corroboró la posibilidad de combinar los mismos en los sistemas productivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar el grado de toxicidad de plaguicidas químicos sobre microorganismos estimuladores del crecimiento vegetal, se utilizó el Método de Difusión Zonal en Placas descrito por Kavanagh en 1974. El medio de cultivo Agar Mueller Hinton (BIOCEN, 2001) se inoculó con el producto obtenido a partir de la fermentación de las cepas microbianas pertenecientes a la Colección de Bacterias Beneficiosas ubicada en el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), relacionadas en la Tabla 1. Las mismas fueron fermentadas en condiciones de zaranda rotatoria a 200 r.p.m de agitación, 30 °C de temperatura, durante 48 horas. Se utilizaron los medios de cultivo DMG-M para *A.chroococcum* (Dibut *et al.*, 2003), YMA para los rizobios (Martínez *et al.*, 2006), SG para *G.diazotrophicus* (Döbereiner *et al.*, 1993) y Caldo Nutriente (BIOCEN, 2001) para los bacilos y *Azospirillum*.

Tabla 1. Microorganismos bioestimuladores utilizados en el estudio

Microorganismo	Cepa
<i>Rhizobium</i> spp	INIFAT Fn-1
<i>Mesorhizobium</i> spp	INIFAT Gr-3
<i>Bradyrhizobium</i> spp	INIFAT SP-1
<i>Azotobacter chroococcum</i>	INIFAT-12
<i>Azospirillum</i> spp	INIFAT Azpcub-2
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	INIFAT E-33
<i>Bacillus megatherium</i>	INIFAT Bm-II
<i>Bacillus subtilis</i>	INIFAT-101

Los plaguicidas, provenientes del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, INISAV, (Tabla 2) se adicionaron de forma pura en los pozos de siete mm, una vez solidificado el medio de cultivo inoculado.

La determinación de la compatibilidad entre microorganismos y plaguicidas, se realizó de forma cualitativa adaptando la escala propuesta por Martínez *et al.* (2007) que cataloga a los halos de inhibición mayores de 0,5 cm como altos (++), entre 0,2 - 0,5 cm como medios (+) e inferiores a 0.2 como bajos (no inhibición o no toxicidad (-)). La medición de los halos se realizó a las 48 horas de incubado el sistema entre 28 y 30°C de temperatura. El experimento se repitió tres veces utilizando seis réplicas por variante.

Para el estudio de adherencia de microorganismos de interés agrícola sobre semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) peletizadas, se emplearon las sustancias que mostraron efecto negativo en el primer ensayo, y una selección de las que alcanzaron

resultados intermedios y positivos en cuanto a tolerancia por parte del microorganismo (dos de cada una). Se adicionaron dos tratamientos: oxiclورو de cobre y *Trichoderma harzianum*. Las semillas se embebieron 10 minutos en los productos líquidos puros obtenidos a partir de la fermentación de las cepas de *Rhizobium*, *B.megatherium*, *B.subtilis* y *A.chroococcum* mencionadas en la Tabla 1 y posteriormente se mezclaron con los plaguicidas. Se dejó orear durante una hora. Posteriormente se tomaron cinco semillas que se suspendieron en nueve mL de agua destilada estéril, para someter la solución resultante al Método de Diluciones Seriadas en Placas Petri (ISO 4833:1991, (1991) e ISO 6887:1993 (1993, citado por Ríos *et al.*, 2011). Se utilizaron para el conteo de UFC los siguientes medios de cultivo: Pikovskaya (citado por Martínez *et al.*, 2006) para *B.megatherium*, Agar Nutriente (BIOCEN, 2001) para *B.subtilis*, Asbhy para *Azotobacter*, y YMA para *Rhizobium* (Martínez *et al.*, 2006). El experimento se repitió tres veces. Los datos obtenidos se agruparon en una media global para cada microorganismo y variante experimental y fueron transformados a log de UFC.semilla⁻¹.

Por último, en condiciones controladas, se determinó el comportamiento de estas semillas peletizadas con plaguicidas e inoculadas con un producto de una concentración de 10¹⁰ UFC.mL⁻¹, obtenido en condiciones de zaranda rotatoria (200 r.p.m y 30°C durante 48 horas), a partir de la cepa INIFAT Fn-1 de *Rhizobium*. El experimento se realizó en macetas plásticas de 2 Kg de capacidad, con una mezcla de suelo Ferralítico Rojo y materia orgánica al 50 %.

Tabla 2. Plaguicidas químicos utilizados en el estudio

Tratamiento	Plaguicidas	Sustancia activa	Acción
1	Poncho	Clotianidin	Insecticida
2	Cropstar	Imidacloprid + tiocarb	Insecticida
3	Celest Top	Tiametoxan + difenoconazol + fludioxonilo	Insecticida / fungicida
4	Gaucho FS-60	Imidacloprid	Insecticida
5	Gaucho MT	Imidacloprid + thiran + pencycuron	Insecticida / fungicida
6	Yunta	Imidacloprid + tebuconazol	Insecticida / fungicida
7	Apron Star	Tiametoxan + mefenoxan + difenoconazol	Insecticida / fungicida
8	Celest	Fludioxonilo	Fungicida
9	TMTD	Thiran	Fungicida

Como indicadores de respuesta del cultivo se evaluó: la germinación (considerando la misma como emergencia de la planta por encima del sustrato) a los 5, 6 y 11 días después de la siembra, la longitud de la raíz, la altura y el peso fresco de la planta, a los 25 días de mantenido el cultivo bajo estas condiciones. Se estableció además una escala de nodulación que comprendió tres grados:

Grado 1. Nodulación débil (0-20 nódulos).

Grado 2. Nodulación moderada (20-50 nódulos).

Grado 3. Nodulación alta (más de 50 nódulos).

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente utilizando un Análisis de Varianza con Prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5% de significación, sobre un Diseño Completamente Aleatorizado. Se empleó para ello el programa STATGRAPH versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los plaguicidas Poncho, Cropstar y Gaucho FS-60, compuestos por las sustancias clotianidin, la mezcla de imidacloprid y tiocarb e imidacloprid respectivamente, no inhibieron el crecimiento de los microorganismos utilizados en el estudio, teniendo en cuenta que los valores de los halos presentados oscilaron entre 0 y 0.17 cm. Las bacterias logran desarrollarse por encima del producto químico empleado, lo que ratifica que no resultan tóxicos para las mismas, aspecto que se aprecia claramente en la Figura 1.

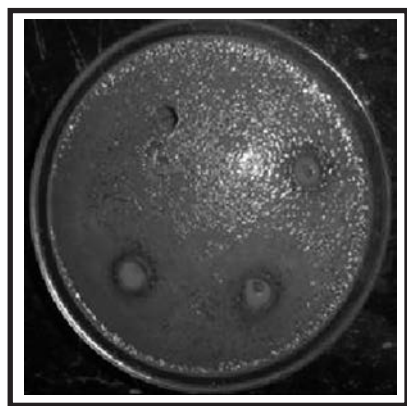


Figura 1. Comportamiento de la cepa de *Mesorhizobium* frente a la sustancia imidacloprid (Plaguicida Gaucho FS-60)

Es de destacar el hecho de que los plaguicidas relacionados anteriormente tienen efecto insecticida, por lo que es de esperar que el mecanismo de acción de los mismos produzca poca afectación sobre las bacterias implicadas en el estudio, teniendo en cuenta la escasa cercanía genética existente entre microorganismos e insectos. Estudios similares utilizando la sustancia imidacloprid (Rivera *et al.*, 2010) demostraron su inocuidad frente al producto comercial Monibac®-Corpoica cuyo principio activo es *Azotobacter chroococcum*. Igualmente sucede para la bacteria endófito *G.diazotrophicus*, para la que los insecticidas fueron los compuestos que ocasionaron menores daños (Madhaiyan *et al.*, 2006).

En la Tabla 3 se muestra la inhibición del crecimiento microbiano que ocasionan los plaguicidas restantes.

Todos estos productos tienen en común la presencia de un componente con actividad fungicida. Existen referencias de afectaciones, en presencia de fungicidas, para el sistema nitrogenasa y la capacidad de solubilización de fósforo y zinc de *G.diazotrophicus*, así como de modificaciones a nivel celular para otros diazotrofos (Madhaiyan *et al.*, 2006), aspectos que pueden estar relacionados con la respuesta de los microorganismos en esta investigación, donde los plaguicidas más agresivos fueron el Gaucho MT (mezcla de imidacloprid+thiram+pencycuron) y el TMTD (thiram), resultando evidente los efectos negativos de la sustancia química thiram sobre la reproducción de los microorganismos (Figura 2).

Entre los rizobios la especie *Bradyrhizobium* resultó ser la más tolerante a la presencia de plaguicidas, solamente afectada de forma moderada por el TMTD (thiram), mientras que la más susceptible fue *Mesorhizobium*, con valores de inhibición altos para las sustancias Celest Top, Apron Star y Celest, sugiriendo que el tiametoxan, difenoconazol, fludioxonilo y mefenozan ejercen efectos negativos sobre la supervivencia del microorganismo. A pesar de ello, y teniendo en cuenta que la colonización de la superficie radical e inicio de la formación de los nódulos depende de otros factores como las señales emitidas por la bacteria y la planta, el pH y la temperatura del suelo, así como de la necesidad nutrimental del cultivo (Charpentier y Oldroyd, 2010)

no se descarta la posibilidad de combinar los mismos como vía para mejorar los rendimientos de leguminosas. Se podría además buscar otras alternativas como aditivos, productos más concentrados o biofertilizantes sólidos, donde el soporte mitigue el efecto de los plaguicidas que provocaron mayor inhibición *in vitro*.

Las especies *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* y *Azotobacter*, caracterizadas por su potencial para la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, fueron fuertemente inhibidas por los plaguicidas Gaucho MT y TMTD, con valores que oscilaron entre medios y altos según la escala propuesta por Martínez *et al.* (2007). Igualmente ocurre para *B.megatherium* y *B.subtilis*.

En otras investigaciones realizadas con la bacteria *Azotobacter chroococcum* no se encontró efecto negativo ante la presencia de la sustancia thiram a la dosis recomendada para su aplicación (Rivera *et al.*, 2010), por lo que el hecho de haber incorporado los plaguicidas al sistema en forma pura, puede haber condicionado la respuesta obtenida. No obstante, existen otras referencias que sustentan la agresividad de este compuesto frente a bacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Bacillus subtilis*, con diferencias entre el comportamiento de las cepas pertenecientes a esta especie bacteriana (Mafia *et al.*, 2009).

Tabla 3. Respuesta de microorganismos de interés agrícola frente a los seis plaguicidas restantes

Microorganismo	Celest Top (Tiametoxan difemetoxan difenoconazol fludioxonilo)	Gaucho MT (Imidacloprid thiram pencycuron)	Yunta (Imidacloprid tebuconazol)	Apron Star (Tiametoxan mefenoxan difenoconazol)	Celest (Fludioxonilo)	TMTD (Thiram)
<i>Rhizobium</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Mesorhizobium</i>	++	+	-	++	++	+
<i>Bradyrhizobium</i>	-	-	-	-	-	+
<i>A.chroococcum</i>	-	+	+	-	-	+
<i>Azospirillum</i>	-	+	+	-	-	+
<i>G.diazotrophicus</i>	-	++	-	++	+	+
<i>B.subtilis</i>	-	+	+	-	-	++
<i>B.megatherium</i>	++	++	+	+	+	++



Figura 2. Comportamiento de la bacteria *B.subtilis* frente a Gaucho MT (Mezcla de imidacloprid thiram y pencycuron)

Los biofertilizantes se aplican a concentraciones superiores a 10^8 UFC.mL⁻¹, lo que asegura una rápida colonización de la rizosfera de los cultivos. Además, los sistemas *in vitro* propician el establecimiento de relaciones mucho más directas que el ambiente natural, por encontrarse las sustancias químicas a mayor concentración que las dosis requeridas para que cumplan sus funciones. Por tal razón se determinó el efecto de los plaguicidas más agresivos y de dos de los que mostraron toxicidad media e inocuidad, sobre la adherencia a la superficie de semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), de las cepas de *Rhizobium*, *B.megatherium*, *B.subtilis* y *A.chroococcum*, demostrándose que los microorganismos logran alcanzar concentraciones que oscilan entre las 10^6 y 10^9 UFC.semilla⁻¹ (Figura 3), con valores muy similares a los obtenidos con el empleo de un bioplaguicida como *Trichoderma harzianum*.

Resulta interesante el hecho de que los productos que contienen el thiram como principio activo no inhiben de forma alarmante la posibilidad de adherencia de los microorganismos, aspecto que constituye sin dudas un resultado muy alentador para acometer investigaciones posteriores en condiciones de producción. Igualmente sucede con Celest Top y Celest, las que en el sistema *in vitro* mostraron una toxicidad moderada. Los organismos presentan adaptaciones evolutivas que pueden disminuir el efecto tóxico de las sustancias químicas. La presencia de endoesporas para el género *Bacillus* (Rodríguez, 2010), de quistes para *Azotobacter* (Martínez *et al.*, 2007) y la excreción de proteínas como la levanosacarasa (Velásquez-Hernández *et al.*, 2010) son ejemplos de variantes que incrementan la posibilidad de supervivencia frente a diferentes condiciones de estrés.

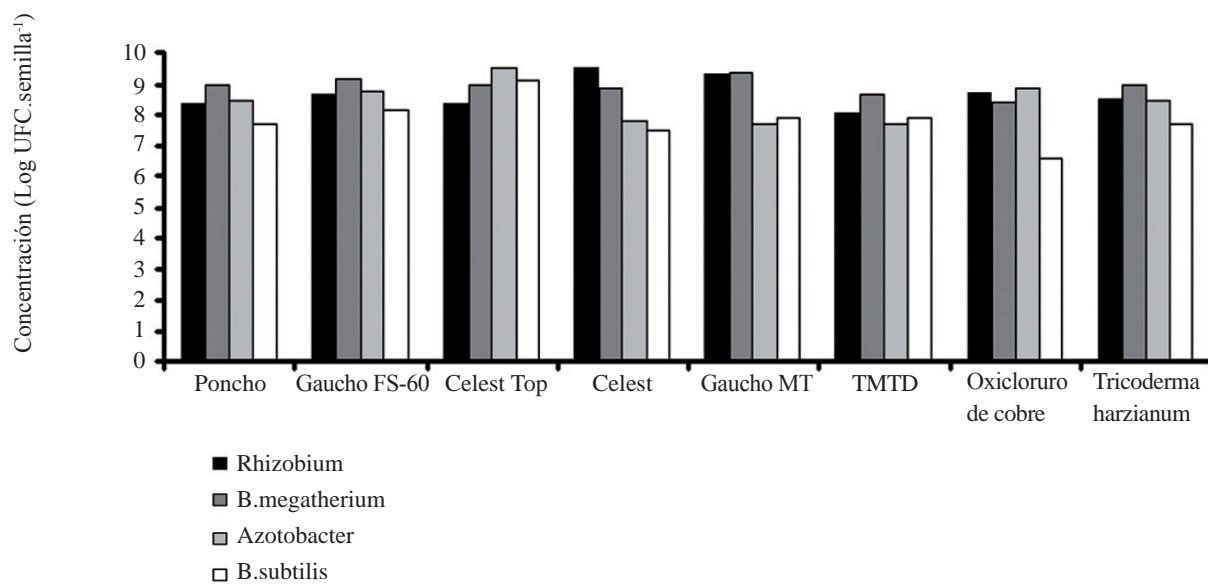


Figura 3. Comportamiento de la concentración de *B.megatherium*, *B.subtilis*, *A.chroococcum* y *Rhizobium* sobre la superficie de la semilla de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) peletizada con plaguicidas químicos

Especial importancia merece la capacidad de adherencia de *A.chroococcum*, *B.subtilis* y *B.megatherium*, pues los mismos pudieran complementar una estrategia de nutrición teniendo en cuenta estudios de co-inoculación rizobios-*Azotobacter* y rizobios-solubilizadores de fósforo, mediante los que se ha logrado favorecer el rendimiento de diferentes cultivos (Afzal y Bano, 2008; Tejada *et al.*, 2008; Dibut *et al.*, 2010 y Rodríguez, 2010).

Para demostrar si existía correspondencia entre el comportamiento de los plaguicidas en condiciones *in vitro* e *in vivo*, se sembraron las semillas peletizadas e inoculadas con *Rhizobium*, en macetas. El plaguicida Celest afectó la germinación de forma considerable (Figura 4), lo que al parecer resulta más una respuesta del cultivo que del propio microorganismo, teniendo en cuenta la poca agresividad mostrada por el mismo en sistemas que exigían un mayor contacto entre ellos. Resulta conveniente no obstante, realizar otras valoraciones con la sustancia activa fludioxonilo para realizar recomendaciones más concretas.

El empleo de los plaguicidas, tanto los que mostraron una fuerte inhibición *in vitro* (TMTD, Gaucho MT) como los que presentaban acciones moderadas (Celest Top, Celest) o nulas (Poncho, Gaucho FS) sobre los microorganismos, permiten que se alcancen resultados muy similares en los indicadores de crecimiento evaluados (Tabla 4), los que a su vez se asemejan a los que se obtienen con el empleo de métodos puramente microbiológicos (bioplaguicida+biofertilizante).

Tabla 4. Respuesta del cultivo de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) a la biofertilización con *Rhizobium* spp previa peletización con plaguicidas químicos

Variante	Longitud Raíz (cm)	Altura Planta (cm)	Peso Fresco Planta (g)
Poncho	22,16 ab	21,37 cd	4,77 a
Gaucho FS	21,52 b	19,86 d	4,58 ab
Celest Top	21,00 b	24,47 b	3,62 cd
Celest	24,77 a	23,53 b	3,94 bcd
Gaucho MT	22,97 ab	26,51 a	4,39 ab
TMTD	22,72 ab	23,24 bc	3,51 d
Oxicloruro de cobre	21,42 b	23,04 bc	4,02 bcd
<i>Trichoderma harsianum</i>	24,15 ab	21,30 cd	4,22 abc
<i>EsX</i>	1,15542	0,70853	0,251534
CV (%)	5,13	3,08	6,09

Medias con letras distintas difieren significativamente para un $\alpha=0,05$

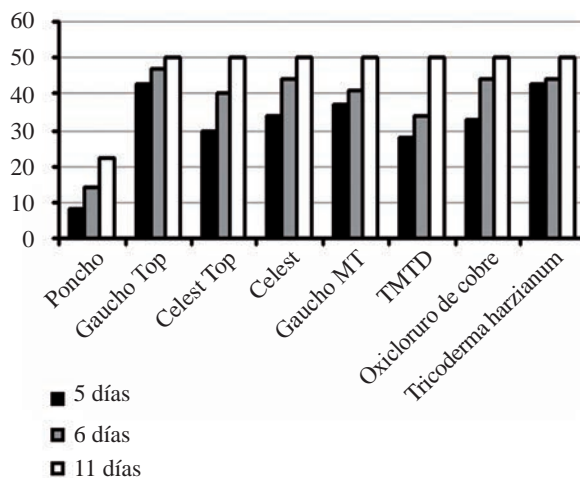


Figura 4. Germinación del cultivo del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) biofertilizado y peletizado con plaguicidas químicos

Sin embargo, la nodulación si se afecta en presencia de los plaguicidas Poncho, Celest Top y el oxicloruro de cobre (Figura 5), destacándose la despigmentación de los nódulos en estos casos, lo que indica que la enzima nitrogenasa no se encuentra activa y que por lo tanto, no se realiza, de forma efectiva, el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Por tal razón se recomienda prestar atención a estos productos, pues el efecto puede ser provocado directamente sobre el cultivo y no sobre el microorganismo.

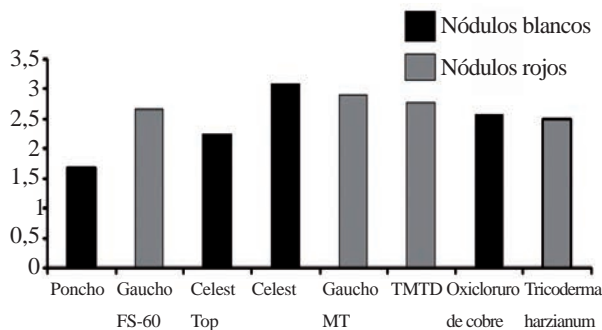


Figura 5. Comportamiento de la nodulación de plantas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) peletizadas con diferentes plaguicidas químicos y biofertilizadas con *Rhizobium*

CONCLUSIONES

Aunque los plaguicidas químicos cuyo principio activo es la sustancia thiram inhiben la reproducción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones *in vitro*, no influyen en la adherencia de *Rhizobium*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum*, *Bacillus megatherium* y *Bacillus subtilis* a la semilla de frijol, por lo que podrían combinarse con *Rhizobium* en el manejo de este cultivo, al igual que otros compuestos con actividad fungicida y/o insecticida.

RECOMENDACIONES

Extender la experiencia con los plaguicidas que mostraron los mejores resultados a condiciones de producción.

Estudiar a nivel de mecanismos fisiológicos, la influencia de los plaguicidas Poncho, Celest Top y el oxicloruro de cobre sobre la nodulación del cultivo del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afzal, A y Bano, A. (2008). *Rhizobium* and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). International Journal of Agriculture and Biology. 10 (1): 85-88.

- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.X., Bodanese-Zanettini, M.H y Passaglia, L.P. (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. Applied Soil Ecology. 39: 311– 320.
- BIOCEN. (2001). Manual de Medios de Cultivo. La Habana. Centro Nacional de Biopreparados. BIOCEN.
- Charpentier, M y Oldroyd, G. (2010). How close are we to nitrogen-fixing cereals?. Current Opinion in Plant Biology.10 (13):556–564.
- 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.
- Dibut, B., R. Martínez Viera., M. Ortega, Y. Ríos y L. Fey. (2010). Obtención de un biofertilizante mixto de amplio espectro de acción. Efecto sobre el cultivo de la rosa (*Rosa spp.*). Agrotecnia de Cuba 34 (1): 2010.
- Döbereiner, J., Reis, V.M., Paula. M.A y Olivares, F. (1993). Endophytic diazotroph in sugarcane, cereals and tuber plants. En: New Horizons in Nitrogen Fixation. R.Palacio., J. Mora y W.E. Newton, Eds. Klumer Academic Publisher, Netherlands. 671–676.
- Kavanagh, F.W. (1974). Métodos para evitar errores en el ensayo microbiológico de antibióticos. J. Pharm. Sci. 63. (9). 1459.
- Madhaiyan, M, Poonguzhali, S, Hari, K, Saravanan, VS, Sa, TM. (2006). Influence of pesticides on the growth rate and plant growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Pest Biochem Physiol 84: 143–154.
- Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Ferreira, E.M., Binoti, D.H.B y G.M Ventura Mafia. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. Tropical Plant Pathology. 34. (1) : 010-017.
- Martínez, R., López. M., Dibut, B., Parra, C y Rodríguez, J. (2007). La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Venezuela. MPPAT. 172 pp.
- Martínez, V. R; López, M; Brossard, F. M; Tejada, G. G; Pereira, A. H; Parra, Z. C; Rodríguez, S. J y Alba, A. (2006). Procedimientos para el estudio y fabricación de Biofertilizantes Bacterianos. Ed. INIA - Maracay. Venezuela, 88 pp.

- Ríos, Y., Ortega, M., Tejeda, G y Rodríguez, J. (2011). Caracterización de cepas de *Bacillus subtilis* con potencial para la elaboración de productos biológicos. *Agrotecnia de Cuba* 35 (2).
- Rivera, D., Germán, E., Obando, M., Bonilla R y Camelo, M. (2010). Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*.7:1. 94-102.
- Rodríguez, J. (2010). "Formulación de un bioproducto mixto a partir de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus subtilis* para el tratamiento de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)". Tesis para optar por el Grado Científico de Máster en Agricultura Urbana. 81 pp.
- Saravanan., V.S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M y Sa, T.M. (2008). Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen fixing *Acetobacteraceae* members. Their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*. 55: 130-140.
- Tejeda, G, G; Rodríguez, S. J; García, G. R; Martínez, V. R; Castellanos, J. J; Dibut, A. B; Ríos, R. Y; Gutiérrez, H. L; Arozarena, D. N; Plana, P. L; Izquierdo, D. L; García, H. A; Ortega, G. M; Croche, A. G; Socas, E. U; Mesa, V. E; Simanca, M. M.E; Fraga, R. S y Fey, G. L. (2008). Obtención de biofertilizantes bacterianos a partir de *Bacillus subtilis*. Convención Internacional Trópico 2008. III Congreso de Agricultura Tropical.
- Velásquez-Hernández, M. L; Baizabal-Aguirre, V.M; Cruz-Vázquez, F; Trejo-Contreras, M.J; Fuentes-Ramírez, L. Bravo-Patiño, A; Cajero-Juárez, A y Chávez-Moctezuma, M.P; Valdez-Alarcón, J.J. (2010). *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Arch Microbiol*. DOI 10.1007/s00203-010-0651-z. Publisher online: 20 de noviembre del 2010.
- Yang, S., Tang, F., Gao, M., Krishnan, H.B y H. Zhu. (2010). R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *PNAS*. 107. (43): 18735–18740.

Recibido:27 de septiembre de 2013

Aceptado: 11 de febrero de 2014