

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON POTENCIAL PARA LA ELABORACIÓN DE BIOFERTILIZANTES

Yoania Ríos Rocafull¹, Marisel Ortega García¹, Marcia Rojas Badia², Daysi Lugo Hernández², Luis Fey Govín¹, Kattia Cañizares Hernández¹ y Bernardo Dibut Álvarez¹

RESUMEN

La caracterización de 16 cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*, demostró la amplia diversidad morfológica, fisiológica, bioquímica y metabólica que puede existir dentro de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de suelos cubanos. Se destaca la forma circular de las colonias y la consistencia mucosa como los caracteres más estables, y el agrupamiento correspondiente a los *Bacillus* como el más heterogéneo. La hidrólisis de proteínas mostró las mayores diferencias intraespecíficas. Todas las cepas fijan nitrógeno atmosférico según su crecimiento en medio semisólido carente de este elemento, aunque las del género *Bacillus* no tienen buenos resultados. Utilizan manitol, glucosa, dextrosa, maltosa, lactosa y sacarosa como fuente de carbono, pero no degradan carboximetilcelulosa. Son capaces de producir ácido indol acético, con superioridad para las especies *A. vinelandii* y *G. diazotrophicus* al liberar más de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta última, en conjunto con el género *Bacillus*, presenta potencial para la solubilización de fósforo, destacándose la cepa B3 de *B. megatherium*. La velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación oscilaron entre 0.13 y 0.50 h^{-1} , con un rápido crecimiento para el género *Bacillus*. La mejor respuesta a la biofertilización se evidenció en el maíz (*Zea mays* L), mientras que el trigo (*Triticum aestivum* L) arrojó el menor número de cepas con interacción positiva. El tomate (*Solanum lycopersicum* L) mostró resultados intermedios. En cuanto a la estimulación, sobresalen por su integralidad las cepas E19 de *G. diazotrophicus*, A17 de *A. vinelandii*, A31 de *A. chroococcum* y B3 de *B. megatherium*, al ejercer efectos positivos sobre al menos dos de los tres cultivos evaluados.

Palabras claves: bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), diversidad microbiana, metabolismo

Characterization of bacteria strains with potential for biofertilizer fabrication

ABSTRACT

The characterization of 16 bacteria strains belonging to the genders *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Gluconacetobacter*, showed the highest morphological, physiological, biochemical and metabolic diversity existing among the plant growth promoting rhizobacteria isolated from Cuban soils. Circular form of colonies and mucus consistence are the most stable characters and the *Bacillus* group showed the highest heterogeneity. Protein hydrolyzes showed the highest difference among the specie. All the strains can fix nitrogen as shown by the

¹Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)

²Departamento de Ecología Microbiana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Cuba.

✉ dpagrobiotec@inifat.co.cu

growth in a semisolid medium without the element, although *Bacillus* strains didn't exhibit good results. They can use manitol, glucose, dextrose, maltose, lactose and sucrose as carbon source, but they don't degrade carboxymethylcellulose. All the strains can produce indol acetic acid with *A. vinelandii* and *G. diazotrophicus* showing the highest levels at values above 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. *G. diazotrophicus* and *Bacillus* can solubilize phosphorus, with B3 strain of *B. megatherium* showing the best results. Growth velocity and duplication time are between 0.13 and 0.50 h^{-1} , with a faster growth for the *Bacillus* genus. The best biofertilization response was found for maize (*Zea mays* L), while for wheat (*Triticum aestivum* L) the number of strains showing positive interaction was the smallest. Tomato (*Solanum lycopersicum* L) showed intermediate results. E19 strain of *G. diazotrophicus*, A17 of *A. vinelandii*, A31 of *A. chroococcum* and B3 of *B. megatherium* are the best for stimulation with positive results in at least two of the three crops studied.

Key words: plant growth promoting bacteria (PGPR), microbial diversity and metabolism

INTRODUCCIÓN

En el suelo existe una notable población microbiana que realiza funciones de gran importancia para este ecosistema. Hace hoy más de cien años que se conoce sobre la actividad beneficiosa de los microorganismos del suelo (Novo y Hernández, 2009). El desarrollo de estas investigaciones dio origen al término biofertilizante para referirse a un producto a base de cepas microbianas, que como resultado de su actividad metabólica, incrementan la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

La capacidad de los géneros *Azotobacter* (Armenta *et al.*, 2010), *Azospirillum* (Lugtenberg y Kamilova, 2009) y *Gluconacetobacter* (Velázquez-Hernández *et al.*, 2010) para realizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico y del género *Bacillus* para la solubilización de fósforo (Beneduzi *et al.*, 2008), hace que los mismos sean atractivos para elaborar productos que contribuyan a la estimulación del crecimiento y el rendimiento de los cultivos. Los ecosistemas cubanos tienen una gran riqueza microbiológica, por lo que conocer las características de las bacterias que en ellos habitan, así como su potencial metabólico, constituye sin dudas un aspecto vital para la elaboración de nuevos inoculantes más efectivos.

A partir de la caracterización morfológica, fisiológica, bioquímica y metabólica de cepas pertenecientes a estos géneros bacterianos, se demostró la diversidad que entre ellos existe, así como la capacidad de algunos

microorganismos de liberar ácido indol acético, solubilizar fósforo y estimular el crecimiento de los cultivos tomate (*Solanum lycopersicum* L), maíz (*Zea mays* L) y trigo (*Triticum aestivum*).

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas: Se utilizaron las cepas B2 de *Bacillus* sp., B3 de *B. megatherium*, B4 de *B. subtilis*, B8 de *Bacillus licheiformis*, Az 4 de *Azospirillum amazonense*, E19, E42, E46 y E47 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, A12, A20 y A31 de *Azotobacter chroococcum* y A14, A17, A25 y A26 de *Azotobacter vinelandii*, todas pertenecientes a la Colección de Bacterias Beneficiosas del INIFAT y aisladas de ecosistemas cubanos.

Caracterización morfológica: La caracterización macromorfológica se realizó a partir del crecimiento de las colonias puras de los microorganismos en los medios Agar Nutriente, Asbhy, Rojo Congo y LGI/P (citados por Martínez *et al.*, 2006). La elección del mismo dependió de la especie implicada. Se utilizó un microscopio estereoscópico a un aumento de 10 X y se describieron los siguientes indicadores: forma, bordes, elevación, superficie, consistencia y color (Harrigan y Mc Cance 1968). La micromorfología se determinó mediante la tinción de Gram y de esporas (Harrigan y Mc Cance, 1968), observada la preparación en un microscopio óptico a 12 000 X.

Caracterización fisiológica y bioquímica: Se ejecutó de forma convencional, a partir de las siguientes pruebas descritas por Harrigan y Mc Cance (1968): determinación de presencia de enzimas (catalasa (Cat) y superóxido dismutasa (Ox)); del potencial de degradación de proteínas (gelatina (Gel), caseína (Cas); almidón (Alm)); utilización de citrato como fuente de carbono (Cit); uso de azufre a partir del crecimiento en medio Kliger (Kliger); motilidad (Mot); fermentación de azúcares (lactosa (Lac), maltosa (Mal), manitol (Man), glucosa (Glu), sacarosa (Sac)); Rojo de Metilo (RM), Vogues Proskauer (VP) y la producción de Indol a partir del triptófano (Ind).

Caracterización del potencial metabólico:

- **Capacidad celulolítica:** Las cepas se crecieron en un medio con carboximetilcelulosa (Herrera, 1985), tomando como positiva la degradación de esta sustancia en el mismo, detectada a partir de la aparición de una zona de decoloración. El sistema se mantuvo durante 10 días entre 28 y 30°C de temperatura.
- **Fijación de nitrógeno atmosférico:** Se utilizaron los medios de cultivos semisólidos referidos en el acápite de caracterización, esta vez carentes de nitrógeno. Los resultados se determinaron de forma cualitativa, a partir del crecimiento o no del microorganismo. Las cepas de *Bacillus* se trabajaron en conjunto con las de *Azotobacter*.
- **Producción de ácido indol acético (AIA):** Se utilizó la metodología de Glickmann y Dessaux (1994). Los microorganismos se cultivaron en medio Caldo Triptona Soya (TSB) en condiciones de zaranda, a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Luego de ajustar la concentración celular a 10^8 células.mL⁻¹, se sembraron al 5% en tubos con igual medio líquido y se incubaron durante 24 horas, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Los cultivos se centrifugaron a 5000 r.p.m durante -15 min. Se tomó 500 µL del sobrenadante y se le añadió 500 µL del reactivo de Salkowski. Esta mezcla se incubó en condiciones de oscuridad durante 30 minutos y se detuvo la reacción exponiéndolo a la luz. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 535 nm en un espectrofotómetro Genesys 20. Paralelamente se realizó una curva patrón empleando soluciones de 5, 10, 15, 20, 60 y 80 µgmL⁻¹ de AIA sintético. El experimento se realizó con tres repeticiones por cepa y como control negativo se utilizó el medio sin inocular.
- **Potencial de solubilización de fósforo:** El medio Pikovskaya (citado por Martínez *et al.*, 2006) se inoculó con los microorganismos a partir de la siembra de colonias gigantes. Se verificó la formación de halo de solubilización a las 48 horas de incubación a 30°C., descartándose los valores inferiores a 0.1 cm. El experimento se repitió en tres ocasiones, con tres réplicas para cada cepa.
- **Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación:** La curva de crecimiento de cada microorganismo se obtuvo en condiciones de zaranda rotatoria a 160 r.p.m de agitación, durante 48 horas, entre 25 y 28 °C de temperatura. Se utilizó el Método de Diluciones Seriadas con la Posterior Siembra en Placas en Petri (ISO 4833:1991, (1991) e ISO 6887:1993 (1993) citado por Ríos *et al.*, 2011) para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC). La velocidad específica del crecimiento y el tiempo de replicación se determinó según Quintero (1993).
- **Potencial estimulador del crecimiento:** Se realizó mediante el Método de Bioensayo o *Screening* (Martínez *et al.*, 2006), en condiciones de casa de cristal. Bandejas de 25 cm² con suelo Ferralítico Rojo, previamente esterilizado, se sembraron con 10 semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) variedad INIFAT-28, maíz (*Zea mays* L) variedad Francisco Mejorado y trigo (*Triticum aestivum* L), respectivamente, las que se inocularon por aspersión después de la germinación, entendiéndose el proceso como la emergencia de la plántula por encima del ras del suelo. Se evaluaron los siguientes indicadores del crecimiento: altura, largo de la raíz, número de hojas, diámetro del tallo, área foliar estimando la misma por el largoxancho de una hoja seleccionada y peso fresco (g). El experimento se realizó por duplicado. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente, según ANOVA, mediante prueba de Rangos Múltiples de DUNCAN al 5% de significación. Se empleó un Diseño Completamente Aleatorizado. Se utilizó el programa STATGRAPH versión 4.0. Para la reproducción de los microorganismos se emplearon

los medios Dimargón-M para las cepas de *Azotobacter*, Caldo Nutriente para los *Bacillus* y *Azospirillum* y SG (citados por Martínez *et al.*, 2006) para *Gluconacetobacter*. La misma se realizó en condiciones de zaranda rotatoria a 160 rpm de velocidad, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, durante 48 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos mostraron una amplia diversidad morfológica. Se destaca la forma circular de las colonias y la consistencia mucosa como los caracteres más estables, y el género *Bacillus* como el grupo más heterogéneo. Las características presentadas coinciden con las descripciones realizadas de las especies involucradas en el estudio, resaltando la coloración amarilla-naranja de las cepas del género *Gluconacetobacter* al crecer en medio LGI (Cavalcante y Döbereiner, 1988); la pigmentación rojo escarlata del género *Azospirillum* en medio Rojo Congo y la consistencia mucosa y el color beige para *Azotobacter* (Holt *et al.* 1994). Este aspecto es igualmente consistente con la prevalencia de las cepas Gram negativas correspondientes a estos mismos géneros, y la presencia de sólo cuatro organismos esporulados, pertenecientes al género *Bacillus* (Holt *et al.*, 1994).

El comportamiento fisiológico bioquímico mostró diferencias entre los microorganismos (Tabla 1), evidenciando la versatilidad por la que se caracterizan como grupo. Se destaca el género *Bacillus* por su heterogeneidad, respuesta que está condicionada a su amplio espectro metabólico (Holt *et al.*, 1994) y a la presencia de más de tres especies en el estudio. La hidrólisis de proteínas, particularmente la gelatina y la caseína, fueron los caracteres con mayores diferencias intraespecíficas.

Todas las cepas utilizan manitol, glucosa, dextrosa, maltosa, lactosa y sacarosa como fuente de carbono. Esta respuesta brinda fuentes alternativas para realizar nuevas formulaciones con las de mayor potencial metabólico, al poder explotar esta gran variedad de sustancias en los medios de cultivo.

La liberación de enzimas degradadoras de celulosa puede constituir una estrategia de supervivencia de los microorganismos en la rizosfera y además contribuir a la eliminación de especies fitopatógenas (Adriano-Anaya *et al.*, 2006). Ninguno de los géneros mostró potencial para degradar carboximetilcelulosa (Tabla 2), a pesar de que existen referencias de cepas con esta habilidad, para *G.diazotrophicus*, debido a la liberación de endoglucanasas, endociloglucanasa y endopolimetilgalacturonasa (Adriano-Anaya *et al.*, 2006). Chaiharn *et al.*, (2008) en sus investigaciones detectaron que algunas cepas del género *Bacillus*, no exhibían esta capacidad, a pesar de existir otras que presentaban resultados positivos.

Para los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* (Lugtenberg y Kamilova, 2009) y *Gluconacetobacter* (Velázquez-Hernández *et al.*, 2010) está bien documentado el potencial para la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, lo que se hace extensivo para algunas cepas del género *Bacillus*. Estos aspectos se reafirmaron en el estudio, según los resultados que se muestran en la Tabla 2.

Producto de la capacidad metabólica de los microorganismos se han desarrollado estrategias de empleo de los mismos para elaborar inoculantes que estimulen el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Todas las especies en estudio se consideran bacterias promotoras del crecimiento vegetal, por lo que sin dudas constituyen variantes promisorias para la elaboración de biopreparados con este efecto.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal presentan más de un mecanismo que puede conllevar a la mejora de los rendimientos de los cultivos. Estos pueden ser activados de forma simultánea o de manera gradual en los diferentes estadios fisiológicos del cultivo. El incremento de la disponibilidad de fósforo y nitrógeno, mediante la solubilización y fijación biológica, respectivamente, y la producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), ejercen una acción directa sobre el metabolismo de la planta (Chaiharn *et al.*, 2008).

La Figura 1 ilustra la liberación de esta hormona por los microorganismos en estudio.

Tabla 1. Caracterización fisiológica y bioquímica de cepas conservadas en el INIFAT

Cód	Cat	Ox	Mot	Cas	Gel	Alm	Ind	VP	RM	Cit	Kliger
B2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
B3	+	+	+	0.15	1.1	1.4	-	-	-	+	-
B4	+	+	+	0.15	0.32	0.38	-	+	-	+	-
B8	+	+	+	0.2	0.70	0.2	-	+	-	+	-
Az 4	+	+	+	-	0.7	0.1	-	-	-	+	-
E19	+	-	+	0.4	-	-	-	-	-	-	-
E42	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E46	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E47	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	+	+	+	0.3	-	0.3	-	-	-	+	-
A14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A20	+	+	+	0.15	0.6	0.5	-	-	-	+	-
A25	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A26	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A31	+	+	+	0.3	-	1.0	-	-	-	+	-
Cód	Cat	Ox	Mot	Cas	Gel	Alm	Ind	VP	RM	Cit	Kliger
B2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
B3	+	+	+	0.15	1.1	1.4	-	-	-	+	-
B4	+	+	+	0.15	0.32	0.38	-	+	-	+	-
B8	+	+	+	0.2	0.70	0.2	-	+	-	+	-
Az 4	+	+	+	-	0.7	0.1	-	-	-	+	-
E19	+	-	+	0.4	-	-	-	-	-	-	-
E42	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E46	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E47	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	+	+	+	0.3	-	0.3	-	-	-	+	-
A14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A20	+	+	+	0.15	0.6	0.5	-	-	-	+	-
A25	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A26	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A31	+	+	+	0.3	-	1.0	-	-	-	+	-

En estudios realizados con el género *Azospirillum* se asocia la liberación de AIA a la estimulación radical que realiza el microorganismo (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Beneduzi *et al.*, (2008) detectaron diferencias en la liberación de AIA para cepas de *Bacillus* con valores que oscilaron entre 2 y 11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, los que se encuentran en el rango de los obtenidos en esta investigación. Por su parte, *Azotobacter* produce importantes cantidades de esta hormona que condiciona su respuesta agrobiológica (Martínez, 2011). En los trabajos de Muthukumarasamy *et al.*, (2002) con *G.diazotrophicus*,

los niveles de producción de la sustancia se encuentran entre 2 y 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, manteniéndose para la mayoría de las cepas entre 6 y 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por lo que podemos concluir que la cantidad de la hormona detectada en este estudio es considerable y que las cepas A17 y A26 de *A.vinelandii* y las cinco pertenecientes a *G. diazotrophicus* tienen grandes posibilidades de ser efectivas para la estimulación del crecimiento vegetal, según los niveles alcanzados.

Tabla 2. Resultados de la evaluación cualitativa de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y de degradar carboximetilcelulosa de cepas de bacterias conservadas en el INIFAT

	Cepa	Fijación biológica de nitrógeno	Capacidad celulolítica
B2	<i>Bacillus</i> sp	+/-	-
B3	<i>B. megatherium</i>	+/-	-
B4	<i>B. subtilis</i>	+/-	-
B8	<i>B. licheiformis</i>	+/-	-
Az4	<i>Azospirillum</i> sp	+	-
E19	<i>G. diazotrophicus</i>	+	-
E42	<i>G. diazotrophicus</i>	+	-
E46	<i>G. diazotrophicus</i>	+	-
E47	<i>G. diazotrophicus</i>	+	-
A12	<i>A. chroococcum</i>	+	-
A20	<i>A. chroococcum</i>	+	-
A31	<i>A. chroococcum</i>	+	-
A14	<i>A. vinelandii</i>	+	-
A17	<i>A. vinelandii</i>	+	-
A25	<i>A. vinelandii</i>	+	-
A26	<i>A. vinelandii</i>	+	-

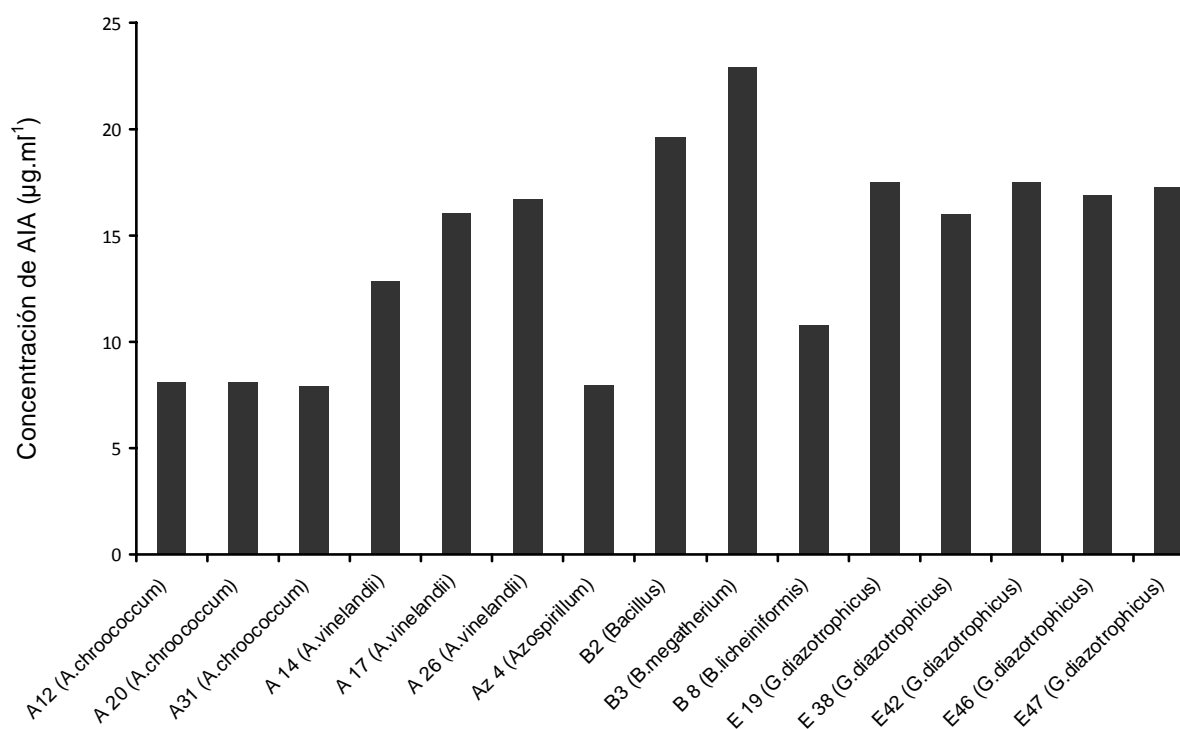


Figura 1. Resultados de la producción de ácido indol acético (AIA) para cepas bacterianas conservadas en el INIFAT

Los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter* se encuentran dentro de los solubilizadores más potentes (Beneduzi *et al.*, 2008; Ali Khan *et al.*, 2009). Dentro del género *Bacillus*, las especies *Bacillus megatherium* y *B.subtilis* se relacionan dentro de las más importantes. (Ali Khan *et al.*, 2009). La solubilización de nutrientes minerales se asocia normalmente a las bacterias rizosféricas; sin embargo, los microorganismos endófitos pueden incrementar la disponibilidad de fósforo para el cultivo hospedero al inicio de la colonización y promover su crecimiento. Se ha observado este potencial en varias cepas de *G. diazotrophicus* (Saravanan *et al.*, 2008).

En la Figura 2 se muestran los resultados respecto a este indicador. Se relacionan solamente las que presentaron un comportamiento positivo.

Se destacan los géneros *Bacillus* y *Gluconacetobacter*, y particularmente la cepa B3 de *B.megatherium*.

Aunque el género *Bacillus* puede liberar enzimas y producir ácidos como mecanismos para solubilizar fósforo (Rodríguez *et al.*, 2006), existen diferencias en el comportamiento de las cepas (Beneduzi *et al.*, 2008), aspecto que se evidencia en los halos de 0.09 y 0.03 cm mostrados por B4 y B8, respectivamente.

A pesar de que para *Azotobacter chroococcum* se describe la existencia de cepas solubilizadoras (Ali Khan *et al.*, 2009), las utilizadas en el estudio tienen una capacidad muy baja, con halos inferiores a los 0.1 cm para la cepa A12.

La combinación de la solubilización de fósforo y la fijación de nitrógeno como atributos que pueden contribuir en la estimulación del crecimiento evidenciada para el género *Gluconacetobacter*, tiene gran atractivo desde el punto de vista de elaboración de biofertilizantes y constituye sin dudas una herramienta a explotar en la búsqueda de alternativas que tributen a un desarrollo agrícola sostenible a partir de la incorporación a los sistemas productivos de nuevos productos.

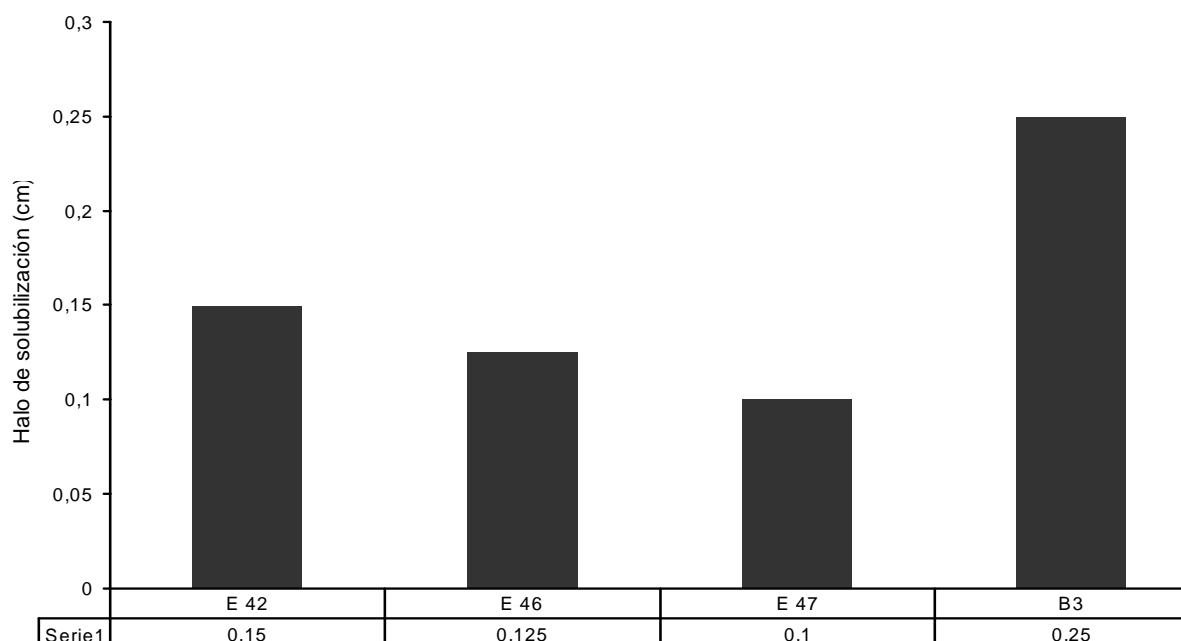


Figura 2. valores de los halos de solubilización en medio Pikovskaya para las cepas con resultados positivos (valores iguales o superiores a 0.1 cm)

La velocidad de crecimiento de los microorganismos y el tiempo de duplicación oscilaron entre 0.13 y 0.5 h⁻¹, destacándose el género *Bacillus* por su rápido crecimiento. Los valores obtenidos se corresponden con las descripciones de las especies implicadas (Siqueira *et al.*, 2009).

El cultivo que mejores resultados arrojó ante su interacción con los microorganismos fue el maíz (*Zea mays* L), mientras que la estimulación sobre el trigo (*Triticum aestivum* L) fue muy baja (Tablas 3, 4 y 5).

Se destacan por su integralidad las cepas E19 de *G.diazotrophicus*, A17 de *A.vinelandii*, A31 de

A.chroococcum y B3 de *B.megatherium*, al estimular los tres cultivos evaluados, por lo que las mismas se recomiendan para la elaboración de nuevos productos destinados al beneficio de los cultivos en los diferentes sistemas de producción.

Existen diversas investigaciones que muestran el potencial estimulador de *Azotobacter* sobre los cultivos del maíz y el tomate en casa de cristal y en condiciones de producción (Lino *et al.*, 2010; Martínez, 2011). Igualmente hay estudios que demuestran la estimulación del crecimiento para el género *Bacillus* en asociación con el trigo, igualmente con diferencias entre las cepas seleccionadas (Beneduzi *et al.*, 2008).

Tabla 3. Comportamiento de indicadores de crecimiento y desarrollo del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L) variedad INFAT-28. Cepas con los mejores resultados

Cepa	Largo de la raíz (cm)	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Área foliar (cm ²)	Peso fresco (g) (valores globales por tratamiento)
E19	7.63 ab	17.06 bcd	0.26 ab	8.71bcd	0,76
A14	8.92 a	21.13 a	0.26 ab	9.92 ab	0,93
A17	8.7 a	21.79 a	0.28 a	11.67 a	0,98
A26	5.94 cde	17.35 bc	0.23 abcd	5.5 def	0,82
A31	5.64f cdef	16.4 cd	0.23 abcd	6.33 de	0,7
Testigo	5.8 cde	14.65 def	0.18 ef	5.56 def	0,39
Esx	0.536729	1.00342	0.01967	0.991925	
CV (%)	9.555	6.307	9.641	14.374	

Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí para $\alpha=0.5$

Tabla 4. Comportamiento de indicadores de crecimiento y desarrollo del cultivo del maíz (*Zea mayz* L) cv. Francisco Mejorado. Cepas con los mejores resultados

Cepas	Largo de la raíz (cm)	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Área foliar (cm ²)	Peso fresco (g)
B3	17.80 d-f	44.50 a	0.3350 a-c	54.55 ab	3.72 a-d
B4	32.47 ab	43.14 ab	0.3178 a-d	52.55 a-c	3.54 b-e
E19	28.75 a-c	39.73 a-d	0.2964 b-e	47.56 a-d	3.40 b-e
E42	30.41 ab	36.30 b-f	0.3144 a-e	38.42 b-e	2.54 d-f
A12	25.19 bc	40.83 a-d	0.3682 a	59.83 a	4.27 a-c
A17	28.57 a-c	39.15 a-d	0.3450 ab	50.66 a-c	5.01 a
A20	27.14 b-e	38.10 b-e	0.2982 c-e	42.01 b-e	3.45 b-e
A31	32.93 ab	38.75 a-d	0.3170 a-d	47.11 a-d	3.48 b-e
Testigo	20.46 c-f	32.56 d-f	0.2724 de	34.46 de	2.66 d-f
EsX	3.4225	2.4855	0.020842	6.0392	0.5078
CV (%)	44.83	22.15	23.81	43.74	53.10

Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí para $\alpha=0.5$

Tabla 5. Comportamiento de indicadores de crecimiento y desarrollo del cultivo del trigo (*Triticum aestivum* L). Cepas con los mejores resultados

Cepas	Largo de la raíz (cm)	Altura de la planta (cm)	Número de Hojas	Área foliar (cm ²)	Peso fresco (g)
B2	20.43 ab	28.65 a-c	4.22 a-c	33.84 a-d	1.51 a
B3	19.47a-c	29.61 ab	4.33 a	35.78 ab	1.09 bc
Testigo	17.97 b-d	26.14 b-e	3.80 a-e	31.71 a-e	1.00 b-d
EsX	0.991	1.529	0.229	2.720	0.104
CV (%)	27.75	24.04	23.17	46.90	60.14

Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí para $\alpha=0.5$

Nótese que en este estudio fueron los únicos representantes que permitieron alcanzar resultados positivos.

La interacción positiva entre *G.diazotrophicus* y los cultivos de maíz y trigo ha demostrado la posibilidad de utilizar el microorganismo como biofertilizante (Luna *et al.*, 2010) extendiendo la posibilidad de realizar un manejo exitoso de un mayor número de cultivos asociados a la especie bacteriana, por lo que las cepas utilizadas de esta especie pueden ser muy útiles en la búsqueda de nuevos productos, teniendo en cuenta la poca explotación desde el punto de vista agrícola que ha tenido este microorganismos a pesar de sus enormes atractivos metabólicos (Saravanan *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta la existencia de otras cepas productoras de AIA se infiere que, aunque la producción de la hormona tiene un papel importante en la estimulación del crecimiento, existen otros mecanismos como el grado de quimiotaxismo, la colonización de la raíz y la producción de otras sustancias que pueden influir en su efecto estimulador del crecimiento sobre los cultivos (Martínez, 2011).

No obstante, teniendo en cuenta que las cepas E19 de *G.diazotrophicus*, A17 de *A.vinelandii*, A31 de *A.chroococcum* y B3 de *B.megatherium* producen esta sustancia o solubilizan fósforo, se recomienda utilizar las mismas en la elaboración de nuevos productos para el beneficio de los cultivos en diferentes sistemas de producción en Cuba, teniendo en cuenta que proceden precisamente de suelos cubanos, y por lo tanto se encuentran bien adaptadas a nuestro ecosistema.

CONCLUSIONES

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de suelos cubanos y conservadas en el INIFAT tienen una gran diversidad morfológica, fisiológica, bioquímica y metabólica, con resultados positivos en la liberación de ácido indol acético y la solubilización de fósforo y con posibilidades de estimular el crecimiento de diferentes cultivos, por lo que pueden ser muy útiles en la elaboración de nuevos biofertilizantes más efectivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriano-Anaya, ML., M.Salvador-Figueroa., J. A. Ocampo e I. García-Romera. Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. Soil Biol Biochem., 38: 879–886, 2006.
- Ali Khan, A., G. Jilani., M. Saleem Akhtar., S. M. Saqlan Naqvi y M. Rasheed. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. J. Agric. Biol. Sci., 1(1):48-58, 2009.
- Armenta, D.A., C. García., J. R. Camacho., M. A. Apodaca., L. G. Montoya y E. Nava. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo. 6 (1). 51-56, 2010.

- Beneduzi, A., D. Peres., L. K. Vargas., M.H. Bodanese-Zanettini y L. M. P. Passaglia. 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, 2008.
- Cavalcante, V.A y J. Döbereiner. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*. 108: 23-31, 1988.
- Chaihan, M., S. Chunhaleuchanon., A. Kozo y S. Lumyong. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *KMITL Sci. Tech. J.*, 8(1): 18-23, 2008.
- Glickmann, E y Y. Dessaux. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 793-796, 1994.
- Harrigan, W.F y M. Mc Cance. *Métodos de Laboratorio de Microbiología*. (ed). Academia, España, 1968.
- Herrera, A.L. *Manual de Medios de Cultivo*. Ed Científico-Técnica, La Habana. 200 pp., 1985.
- Holt, J.G., N.R. Krieg., P.H.A. Sneath., J.T. Staley y S.T. Williams. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition, 1994.
- Lino, a., Y. Ríos., N.J. Arozarena., B. Dibut., G. Croche., J. Fernández., H. Ramos., S. Álvarez., M. Ortega y L. Fey. Efecto de la aplicación conjunta del Fitomas y Azomeg, en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*, L) var. INIFAT-28, en condiciones de macetas. *Agrotecnia de Cuba*. 34 (1): 43-48, 2010.
- Lugtenberg, B y F. Kamilova. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541–56, 2009.
- Luna, M.F, Galar., M. L., Aprea, J., Molinari. M. L y J. L. Boiardi. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol Lett.* 32:1071–1076, 2010.
- Martínez, R. Establecimiento de las bases científicas para la fabricación de biofertilizantes y bioestimuladores bacterianos de tercera generación. Tesis para Optar por el Grado de Doctor en Ciencias, 2011.
- Martínez, V. R.; López, M; Brossard, F. M; Tejada, G. G; Pereira, A. H; Parra, Z. C; Rodríguez, S. J y A. Alba. *Procedimientos para el estudio y fabricación de Biofertilizantes Bacterianos*. Ed. INIA - Maracay. Venezuela, 88 pp., 2006.
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, S. Seshadri y C. Lakshminarasimhan. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *CURRENT SCIENCE*, 83: 2. 137-145, 2002.
- Novo, R y J. Germán. *Historia de la microbiología del suelo en Cuba*. Ciudad de La Habana. Editorial Universitaria., 34 pág., 2009.
- Quintero, R. *Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones*. Ed. Alambra. México, 1993.
- Ríos, Y., Ortega, M., Tejada, G y J. Rodríguez. Caracterización de cepas de *Bacillus subtilis* con potencial para la elaboración de productos biológicos. *Agrotecnia de Cuba* 35 (2), 2011.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, m., Osborne, J., Thangaraju, M y T.M. Sa. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen fixing *Acetobacteraceae* members. Their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*. 55: 130-140, 2008.
- Siqueira., E.R., Cardoso., E. Oliveira., E. M. Moura., E. V. Quintana y E. Amorim. Glycine Betaine Enhances Growth of Nitrogen-Fixing Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Under Saline Stress Conditions. *Curr. Microbiol.* 59:593–599, 2009.
- Velázquez-Hernández, M., Baizabal-Aguirre, V, Cruz-Vázquez, F, Trejo-Contreras, M., Fuentes-Ramírez, L., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, P y J. Valdez-Alarcón. *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, 2010.

Recibido: 10 de abril de 2011

Aceptado: 23 de septiembre de 2011