

AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE LA ZONA DEL MACIZO MONTAÑOSO DE GUAMUHAYA

Marisel Ortega García¹, Yoania Ríos Rocafull¹, Ignacio Caraballo Barreto², Néstor García González², Bernardo Dibut Álvarez¹ y Rafael Martínez Viera^{*1}

RESUMEN

A partir de un muestreo realizado en la zona del Macizo Montañoso de Guamuhaya, se purificaron tres aislados bacterianos morfológicamente diferentes, según su crecimiento en los medios selectivos empleados. La caracterización morfológica-fisiológica y bioquímica de los mismos, se realizó mediante 19 pruebas. Se compararon los resultados con las referencias del Manual de Sistemática para Bacterias. Esto permitió identificar dos de los microorganismos como *Beijerinckia fluminensis* y el otro como *Bacillus megatherium*. Se comprobó que las tres cepas solubilizan fósforo inorgánico y fijan nitrógeno atmosférico, lo que indica que tienen potencial para la elaboración de biofertilizantes.

Palabras claves: ecosistemas atípicos, microorganismos estimuladores, muestreo

Isolation of bacteria with biofertilizer potential of guamuhaya mountain

ABSTRACT

By samplings carried out in the Mountainous area of the Solid one of Guamuhaya, they became purified three bacterial isolates that were different morphologically, evidenced in their growth in the selective culture that were used. It was morphological-physiologic and biochemistry strain characterization by 19 tests and the obtained results were compared with the Systematic proceeding for Bacterias references, what allowed identifying two of them as *Beijerinckia fluminensis* and the other one as *Bacillus megatherium*. It was also proven that the three microorganisms are capable of solubilizen inorganic phosphorous and to fix atmospheric nitrogen, what indicates they are potential strain for biofertilizantes elaboration.

Key words: atypical ecosystem, stimulator microorganism, sampling

¹ Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical «Alejandro de Humboldt» INIFAT

² Corporación CIMEX, Finca Mayarí, Escambray Cienfuegos

✉ biofersuelos@inifat.co.cu

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de aislados nativos de microorganismos del suelo, fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo y potasio, de diferentes ecosistemas resulta fundamental para la obtención de productos efectivos en la agricultura como biofertilizantes para estimular el crecimiento y desarrollo de cultivos de importancia económica (Martínez *et al.*, 2007).

La Finca Mayarí, asentada en la comunidad del mismo nombre, en el macizo montañoso de Guamuhaya, Municipio Cumanayagua Cienfuegos, se encuentra situada a los 730 metros de altura sobre el nivel del mar, con antecedentes de cultivos cafetaleros y paperos. En el año 1982 se comenzó a explotar la siembra de plantas ornamentales importadas y autóctonas, teniendo en cuenta las bondades naturales que presenta esta pequeña área de difícil acceso, que le da gran valor a producciones exclusivas.

Esta región se caracteriza por una temperatura diferente a la media para Cuba, pues oscila entre 19-26°C. El régimen de precipitaciones totales es de 2310.5 mm³, mientras que la humedad relativa es del 84 % (Estación Agrometeorológica de Experimentación de Caña, Escambray y la Estación de Topes de Collantes, 2010). Predomina un suelo Ferralítico Rojo, mosaico de montaña (Hernández, *et al.* 1999), con un pH 7.10 y un contenido de materia orgánica de 1.71, aproximadamente.

Los microorganismos nativos constituyen una vía efectiva de garantizar los buenos resultados con la aplicación de inoculantes que contribuyan a la obtención de producciones estables en los ecosistemas (Pérez *et al.*, 2000; Danhom *et al.*, 2007; Bashan *et al.*, 2008; Mahalakshmi *et al.*, 2009). Para ello se necesita el aislamiento de los mismos, así como la caracterización y evaluación de su potencial agrobiológico *in vitro*, lo que constituye el objetivo principal de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la colecta de 10 muestras de suelo en un área de dos hectáreas de la Finca 4 del CIMEX (Mayarí, Escambray) se separaron 10 g que se suspendieron en

100 mL de agua destilada estéril. La solución obtenida se inoculó sobre placas Petri de 9 cm con medio de cultivo Pikoskaya y Asbhy citados por Martínez *et al.*, 2007, las que se purificaron mediante siembra por agotamiento y se incubaron a 30°C, durante 48 horas.

Para realizar la caracterización morfológica de los aislados se utilizaron los medios Asbhy y Agar Nutriente (BIOCEN, 2001) y para evaluar su pigmentación medio Asbhy con benzoato (Martínez *et al.*, 1985) después de 15 días de incubados, así como la presencia de cápsula, espora y el comportamiento frente a la tinción de Gram.

La caracterización fisiológica-bioquímica se realizó mediante las siguientes pruebas: oxidasa (Ox), catalasa (Cat), degradación de proteínas: gelatina (Gel), almidón (Al) y caseína (Cas), utilización de citrato como fuente de carbono (Cit), producción de Indol a partir de triptófano (Ind), motilidad (Mot) y utilización de azúcares: manitol (Man), maltosa (Mal) y lactosa (Lat) (Harrigan y Mc Cance, 1968)

Para la identificación de los microorganismos se utilizó el Manual de Sistemática para Bacterias (Holt *et al.*, 1994).

Se determinó el potencial metabólico *in vitro* de los aislados mediante el crecimiento en medio Asbhy sin adición de fuente de nitrógeno (para evaluar la capacidad de fijación de este elemento), para la determinación del potencial solubilizador se realizó la medición del halo de solubilización en medio Pikovskaya (Martínez, 2006).

Los datos obtenidos a partir de seis repeticiones en los diferentes ensayos, se procesaron estadísticamente a partir de un ANOVA al 5% de significación, utilizando el programa STAT-ICTF 4.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del muestreo realizado a la zona del Macizo Montañoso de Guamuhaya se purificaron tres aislados bacterianos teniendo en cuenta sus potencialidades como fijadores de nitrógeno y solubilizador de fósforo del suelo. Los microorganismos muestran algunas diferencias en cuanto a su morfología, tanto macroscópica como microscópica, lo que permite diferenciarlos entre ellos (Tabla 1).

En cuanto a la caracterización fisiológico-bioquímica de los tres aislados se observó que los tres microorganismos presentan características semejantes, además de estas pruebas y la caracterización morfológica, permiten profundizar en su ubicación taxonómica (Tabla.2).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la descripción referida en el Manual de Sistemática para bacterias Bergey's (Holt *et al.*, 1994), los aislados 1 y 2 se identificaron como *Beijerinckia fluminensis*, a pesar de las diferencias morfológicas presentadas, ya que esta especie, según la bibliografía, varía en cuanto a su pigmentación y el tercer aislado se identificó como *Bacillus megatherium* según las características definidas para este género.

El potencial metabólico *in vitro* mostró resultados positivos, ya que los tres aislados crecen en un medio carente de nitrógeno, para lo que tendrían que tomar este nutriente de la atmósfera (Martínez *et al.*, 2007). Por otro lado, demostraron su potencial solubilizador de

fósforo, teniendo en cuenta los valores de halo de solubilización mostrados en la Tabla 3. El mismo puede deberse a mecanismos biológicos de los microorganismos los que permiten se rompan los enlaces moleculares, además de la presencia de enzimas fosfatasas, máximas responsables de la descomposición de los fosfatos orgánicos (Chuang, *et al.*, 2006; Chen, *et al.*, 2006; Biu *et al.*, 2009).

En el caso de las tres cepas se muestran resultados alentadores en cuanto a sus potencialidades de uso para la agricultura como biofertilizantes. El género *Bacillus* es solubilizador de fósforo por excelencia, por lo que el tamaño del halo de solubilización es sin dudas un indicador de gran importancia para evaluar su potencialidad, dada la concordancia de estas pruebas con el comportamiento que tienen los microorganismos en su ambiente natural (Chen *et al.*, 2006; Danhom *et al.*, 2007; Bashan *et al.*, 2008) por lo que se puede inferir que los mismos contribuirán al aumento de la disponibilidad de este nutriente una vez aplicado el inoculante. En el caso de las cepas 1 y 2 pertenecientes

Tabla 1. Caracterización morfológica de tres aislados provenientes de Escambray cienfueguero

	Ox	Cat	Gel	Alm	Cit	Cas	Mot	Ind	Man	Lac	Ma1	HL
1	+	+	0.9	0.5	+	0.15	+	-	+	+	+	+
2	+	+	0.5	0.2	+	0.6	+	-	+	+	+	+
3	+	+	1.1	1.4	+	0.5	+	-	+	+	+	++

Tabla 2. Caracterización fisiológico-bioquímica de tres aislados provenientes del Escambray cienfueguero

	Descripción Placas (48horas)	Tinción de Gram	Tinción de cápsula	Tinción espora	Pigmento (c/edad)	Pigmento en Asbhy con benzoato
1	Circular, translúcida, convexa, entero, Beige. (Asbhy).	Bacilo Gram negativo	+	-	Beige	Ninguno
2	Circular, punto central irregular, transparente. (Asbhy).	Bacilo Gram negativo	+	-	Amarillo-naranja	Beige oscuro
3	Irregular, con rebordes, plana. Abundantes gránulos. (Agar Nutriente).	Bacilo Gram positivo largo, Gueso, en cadenas.	+	+	No necesarias	

al género *Beijerinckia* resultan muy eficientes como fijadoras de nitrógeno atmosférico y del suelo, por la capacidad de las mismas de aprovechar este elemento de forma nativa.

Tabla 3. Potencial metabólico «in vitro» de los tres microorganismos del suelo aislados del Macizo Montañoso de Guamuhaya

	Solubilización de fósforo inorgánico (Halo de solubilización en cm)	Diámetro de la colonia en medio Asbhy
1	0.24	0.49
2	0.25	0.52
3	0.45	0.35

La posibilidad de realizar ambos procesos les brinda a estas cepas particular importancia, pues con una sola aplicación se combinarían los mismos, incrementando la disponibilidad de ambos nutrientes y un mayor beneficio para los cultivos (Martínez *et al.*, 2006; Garbeva *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Las cepas de *Beijerinckia fluminensis* y *Bacillus megatherium*, aisladas del macizo montañoso de Guamuhaya, resultan promisorias para la elaboración de inoculantes microbianos con efecto estimulador y posibilidades de uso para la agricultura.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de microbiología del suelo en diferentes ambientes, con vistas a buscar cepas efectivas para ecosistemas y cultivos heterogéneos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bashan, X, M. Puente, L. E de- Bashan and J. P. Hernandez (2008): Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. *Plant-Microbe Interactions*. 69-93.
 BIOCEN. (2001). Manual de Medios de Cultivo. La Habana. Centro Nacional de Biopreparados.

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).
 Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A and Young, C.C. (2006): Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 34: 33–41.
 Chuang, Q. Z and Wei, Y.H (2006): Effects and mechanism of P-Solubilizing *Bacillus P-17* Strain on phosphorous Solubilization of different phosphate rocks. In : *Acta Pedologica Sinica* 41 (6): 931-937.
 Estación Agrometeorológica de Experimentación de Caña, Escambray y la Estación de Topes de Collantes (2010): Comunicación personal.
 Danhom, T and C. Fuqua (2007): Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Ann. Rev. Microbiology* 61: 401-442.
 Garbeva, P, van Elsas. J.D and J.A van Veen (2008): Rhizosphere microbial community and response to plant species and Soil History. *Plant Soil* 302: 19-32.
 Harrigan, W.F y M. Mc Cance. (1968): Métodos de laboratorio de Microbiología. (ed). Academia, España.
 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.
 Hernández, A y Pérez, L. (1999): Nueva Versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Inst. Suelos, AGRINFOR, La Habana, 64 pp.
 Martínez, J., A. Sánchez., M. Quintana., V. Pazos y G. del Barrio. (1985): *Microbiología General*. Universidad de La Habana. Facultad de Biología. SNLC. CU 01. 29490. 3.
 Martínez, R., M. López., B. Dibut., C. Parra y J. Rguez. (2007): La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Venezuela. MPPAT. 172 pp.
 Mahalakshmi, S and D, Reetha (2009): Assessment of plant growth promoting activities of bacterial isolates from the rhizosphere of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Research in Science and Technology* 1(1): 26-29.
 Pérez, J. M., Suárez, E. y Vega, E. (2000): Características genéticas y factores limitantes de la agroproduktividad de los suelos del macizo montañoso Guamuhaya. Informe para proyecto 007-01-002, Instituto de Suelos, MINAG, 30 p.

Recibido: 10 de septiembre de 2011
 Aceptado: 5 de marzo de 2012