

AVANCES DE LA ASOCIACIÓN *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* – PLANTAS CULTIVABLES. INTERÉS AGRONÓMICO Y COMERCIAL.

Bernardo Dibut Alvarez, Rafael Martínez Viera, Marisel Ortega García, Yoania Ríos Rocafull, Grises Tejeda González, Rosa García Gómez, Luis Fey Govín, Janet Rodríguez, Maria Elena Simanca, Ulises Soca, Katia Jiménez y Graciela López.

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical
“Alejandro de Humboldt”.*

bdibut@inifat.co.cu

RESUMEN

Desde hace más de una década se ha logrado acumular valiosos aislamientos de la bacteria endófitra *Gluconacetobacter diazotrophicus* que han mostrado un efecto agrobiológico favorable sobre diferentes cultivos de importancia económica de las más variadas especies de plantas. Estos materiales se encuentran ubicados en la colección de FBN del grupo de Microbiología-Bioquímica del INIFAT y varios de ellos constituyen nuevos reportes para la ciencia en relación a su asociación con determinadas especies vegetales; de aquí el mayor impacto científico. En relación al efecto agronómico, los aislados, previa selección genética por métodos de bioscreening y experimentación campo, han mostrado una respuesta favorable en cuanto a su actividad estimuladora y nitro fijadora, lográndose obtener aumentos significativos entre 23-34% en el rendimiento agrícola y la calidad de frutos, raíces y tubérculos cosechados con relación a las plantaciones no inoculadas, y como consecuencia la incidencia de diferentes impactos en lo económico, ambiental, tecnológico y social. En el ámbito comercial se presenta la estrategia de inoculación de cultivos con alto contenido de azúcares en base a una nueva biotecnología (patente cubana) que incluye la presencia de una nueva formulación nutritiva más eficiente y menos costosa en comparación con los medios de cultivos reportados en la literatura para el crecimiento de esta especie bacteriana bajo condiciones de laboratorio.

Palabras claves: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, biofertilizante, cultivos económicos.

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* bacteria, descubierta solo hace unos pocos años, presenta la ventaja desde el punto de vista agroecológico de asociarse a especies vegetales con altos contenidos de azúcares, obteniéndose notables beneficios en relación a la ganancia de nitrógeno en las plantas como consecuencia de la capacidad nitro fijadora del microorganismo e incrementos en el rendimiento debido a la capacidad de producción de sustancias fisiológicamente activas que igualmente lo caracteriza (Stephan *et al.*, 1991, Loganathan *et al.*, 1999 ; Lambrecht *et al.*, 2000; Reis-Junior *et al.*, 2000; Riggs *et al.*, 2001).

Un grupo de cultivos de especial interés para ser beneficiados con asociaciones de este tipo como es el caso de las hortalizas, frutales y viandas tropicales, ya que a pesar de que se siembran ciento de miles de hectáreas de estos cultivos al año en Cuba, la producción que se logra es baja debido a los bajos rendimientos que se obtienen sobre todo en viandas tropicales y frutales (MINAGRI, 2000). Muchos son los factores que influyen en este comportamiento, pero se destacan el mal manejo de semillas, los daños ocasionados por plagas y enfermedades, la deficiente agrotecnia y el escaso aseguramiento de insumos para el riego y los fertilizantes; en este último renglón cabe destacar que hoy sólo se fertiliza menos del 30% de las áreas de viandas

y en este mismo orden se han visto igualmente afectadas las áreas hortícolas (Ruiz, 2001).

Hasta ahora en el mundo no existe un biofertilizante comercial ha base de este microorganismo y solo los estudios se limitan a algunas especies vegetales bajo condiciones experimentales, obteniéndose los mejores resultados en la estimulación del sistema planta y/o en la capacidad de fijar el dinitrógeno.

Por todo lo planteado anteriormente, se hace imprescindible demostrar la presencia, diversidad y el efecto de la bacteria, vía inoculación, en estos cultivos para el país, unido a la factibilidad de incrementar los rendimientos hasta niveles económicamente rentables sobre todo por el papel que juegan en la entrega de volumen alimentario a la población. En este sentido, una de los recursos a explotar es el empleo de tecnologías limpias como es el caso de los biofertilizantes, donde ya se han logrado importantes avances con el empleo de algunas especies microbianas (Dibut *et al.*, 1996 y Ruiz 2001), pero todas limitadas en su accionar a la zona rizosférica de las plantas, por lo que es necesario ampliar el potencial de la asociación planta–microorganismo explorando las relaciones endofíticas. Con este fin, se desarrolló el presente trabajo.

MATERIALES y MÉTODOS

Todos los ensayos en el caso de las viandas tropicales y la remolacha se realizaron entre los años 2001-2006 sobre áreas experimentales y de producción pertenecientes a las siguientes entidades: Campos de Autoconsumo del INIFAT, ECV. Güira de Melena, CCS Antonio Maceo, Santiago de las Vegas. Los estudios a escala experimental en papaya se desarrollaron durante los años 2001-2003 en áreas agrícolas del INIFAT, cultivando la variedad MARADOL roja sobre suelo Ferralítico Rojo (Instituto de Suelos 2000) empleando un diseño de Bloques al Azar con un tamaño de parcela de 75 m² con cinco réplicas por cada variante experimental y utilizando una distancia de siembra de 4x1.5x1.5, con fecha de plante entre el 5 – 11 de Febrero en ambas campañas.

El biopreparado se obtuvo cultivando la bacteria en medio SG (Döbereiner *et al.*, 1993) inoculando alícuotas de 100 mL de medio en erlenmeyers de 500 mL de capacidad e incubando los frascos en zaranda rotatoria a 300 r.p.m. de agitación y 32°C de temperatura. El bioproducto (ACESTIM) se aplicó con ayuda de una mochila fitosanitaria a dosis de 2 L/ha del biopreparado en una solución final de trabajo con agua común. La aplicación se realizó en horas avanzadas de la tarde para facilitar la penetración por vía estomática y evitar la incidencia de los fuertes rayos solares sobre el biopreparado acabado de depositar en la superficie foliar de las plantas o en suelo, además a este horario la velocidad del viento es menor, lo cual ayuda sobremano a lograr una aplicación más homogénea sobre el suelo y las plantaciones. La población bacteriana del producto osciló en todo momento entre 3.4 - 3.5 x 10¹¹ UFC/mL.

En este caso las dos variantes consistieron en el tratamiento inoculado (aspersión foliar y al suelo de la planta) y el control sin inocular. En todos los casos las atenciones culturales se efectuaron según las indicaciones recomendadas por el instructivo técnico de cada cultivo (Ministerio de la Agricultura 1990, 1999) y se evaluó al azar microparcando en forma diagonal todo el campo en pequeñas parcelas de 50 m², empleando diez réplicas por cada tratamiento (testigo e inoculado) y finalmente comparando los valores de rendimiento obtenidos en la parcelación con los aportados por los productores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se evidencia el efecto de la bacteria al tratar plántulas de papaya con quinta hoja verdadera. Como se evidencia, todos los parámetros de crecimiento y

desarrollo de las plántulas fueron estimulados con relación al control. La altura promedió un 65% de aumento, así como otros parámetros que están más relacionados con la calidad de la postura como el número de hojas (18% de incremento), el diámetro del tallo (76%) y la biomasa (25%), los cuáles también fueron potencialmente mejorados con la inoculación.

Tabla 1. Efecto de la aplicación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre plántulas de papaya bajo condiciones de vivero.

Variante	Altura (cm)	Nº de hojas	Diámetro tallo (mm)	Biomasa g/pl
Testigo	13.32 b	6.60 b	1.06 b	29.88 b
Inoculado	122.10 a	7.81 a	1.89 a	37.51 a
Esx	0.45	0.86	0.90	0.71
CV (%)	6.63	9.35	4.86	5.50

Nota: Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con $p < 5\%$.

La asociación de la bacteria *G.diazotrophicus* con el cultivo de la papaya manifiesta un notable aumento en la productividad de este sistema planta-microorganismo. En este orden, si tenemos en cuenta que el aumento promedio del rendimiento en relación a las plantaciones sin tratar durante varias campañas de experimentación y extensión es de 25 t/ha, y considerando que el valor de una tonelada de fruta fresca madura de papaya corresponde a \$ 4 500, el efecto económico por este concepto sería de \$ 112 500 por cada hectárea del cultivo aplicada . Por otra parte, cada litro de producto tiene un costo de \$ 13.27, por lo que el volumen total a aplicar en una hectárea representa un valor de \$26.54, más \$2.63 por concepto de costos de aplicación, para un total de \$ 29.17 / ha .

En la Tabla 2, se muestra la respuesta de las plantas a la inoculación en el momento de la cosecha. El rendimiento se incrementó en un 38%, con la obtención de aproximadamente diez kilogramos más por planta inoculada en relación con las plantas controles sin tratar. La calidad de los frutos se mostró mayor al aplicar la bacteria con aumentos de 12,17 y 25% en el largo, diámetro y peso en comparación con los frutos provenientes de las plantaciones no tratadas.

Tabla.2. Comportamiento de plantaciones de papaya en cosecha al ser tratadas con *G.diazotrophicus*. Campaña 2001-2002.

Variante	Largo/fruto (cm)	Diámetro/fruto (cm)	Peso/fruto (kg)	Rendimiento (kg/pl)	Rendimiento T/ha.
Testigo	20.67	10.85	1.52 b	29.11 b	64.71
Inoculado	23.20	12.71	1.90 a	40.23 a	89.53
Esx	0.901	0.424	0.82	0.547	0.60
CV (%)	15.28	13.36	19.14	11.39	13.24

Nota: Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con $p < 5\%$.

De acuerdo con este análisis la relación beneficio/costo de la aplicación del biopreparado resulta elevada, con un valor aproximado de más de 3750:1. El hecho de constituir esta asociación un primer reporte, le confiere un marcado impacto científico al resultado. A esto se le une un notable impacto ambiental por concepto de la aplicación de un producto biodinámico en equilibrio con el agroecosistema, contribuyendo así a la descontaminación del mismo. El hecho de disponer de un

mayor volumen de frutos frescos para el consumo de la población o la industria, igualmente le confiere un apreciable impacto social al resultado, unido al impacto tecnológico por concepto de la introducción en la práctica agrícola de un nuevo método biotecnológico para el mejoramiento de la producción vegetal.

En el estudio correspondiente a la asociación *G.diazotrophicus* - *Beta vulgaris* .var Detroit, los valores de concentración bacteriana obtenidos en diferentes órganos (Tabla 3) coinciden con los referidos en la literatura para microorganismos endófitos (Hallmann *et al.*, 1997). La presencia del microorganismo en el interior de las hojas y tallo del cultivo aún cuando este no se inoculara ratifica el carácter de endófito de la bacteria (Döbereiner *et al.*, , 1993) y apoya la idea de su asociación con cultivos ricos en sacarosa (Dibut *et al.*, 2004).

Tabla 3. Distribución de *G.diazotrophicus* en plantas de remolacha testigos e inoculadas.

Variante	órgano	15 días	30 días	45 días
Testigo	Hojas	1.05 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁵	0
	Tallo	1.02 X 10 ²	0	0
Inoculado	Hojas	2.5 X 10 ⁴	1.2 X 10 ⁶	2.15 X 10 ⁵
	Tallo	1.35 X 10 ⁴	0	0

*Concentración en UFC/g de cultivo.

La mayor concentración de la bacteria en las hojas pudiera ejercer un efecto directo del microorganismo sobre las reacciones fotosintéticas que tienen lugar en ese órgano, haciendo más eficiente el proceso, lo que se traduciría en un incremento sobre diferentes parámetros fisiológicos del cultivo. El efecto estimulador sería mayor en las plantas inoculadas ya que como se puede apreciar en la tabla, la bacteria no sólo alcanza una mayor concentración en las mismas, sino que es capaz de persistir en el interior del vegetal por un mayor período de tiempo lo que dota al cultivo de una potente maquinaria interna capaz de estimular su crecimiento y desarrollo, efecto mostrado desde los 15 días posteriores a la inoculación (tabla 3).

El incremento de entre 40% y 70% observado al finalizar el ciclo de cultivo del vegetal para el caso del peso de las hojas, área foliar, diámetro del tallo y más del doble para el peso de los bulbos (tabla 4) es el resultado del mejor funcionamiento integral en el cultivo inoculado.

Tabla 4. Efecto agrobiológico de *G.diazotrophicus* sobre el cultivo de la remolacha al finalizar el ciclo del vegetal.

Variante	Diámetro del tallo (mm)	Altura de la planta (cm)	Área foliar (cm ²)	Peso raíz (g)	Peso de las hojas (g)
Testigo	5.12 b	40.4 b	223.6 b	62.36 b	105.72 b
Inoculado	6.36 a	49.8 a	311.2 a	149.88 a	147.58 a
Esx	0.338	1.732	1.238	7.869	1.143
CV %	5.88	3.84	4.80	7.41	9.03

*Nota : Medias con distintas letras difieren significativamente entre sí según prueba t-Student al 5% de significación.

Una mayor área foliar, igualmente supone una mayor superficie de contacto para la realización de la fotosíntesis, lo que unido a la estimulación constatada tras 15 días de inoculación, permite una mayor acumulación de fotosintatos que condiciona la obtención de plantas con mayor desarrollo, los cuales presentan bulbos de más peso.

En la Tabla 5 a y b se muestra el efecto de la inoculación foliar y al suelo del microorganismo sobre el cultivo del boniato en dos años de experimentación sobre áreas de autoconsumo de la CCS Antonio Maceo, Santiago de Las Vegas. En ambas campañas de siembra, el biopreparado logró incrementar el largo de las plantas en 33-34 %; el número de hojas entre 31-62%; el diámetro del tallo entre 38-40% y el diámetro del tubérculo entre 34-45%. Este comportamiento se corresponde con la respuesta encontrada en la fase experimental al comparar el tratamiento inoculado (foliar y al suelo) en comparación con el control (sin inocular).

Tabla 5. Respuesta del cultivo del boniato a la inoculación con *G. diazotrophicus*, cepa INIFAT Abn1.

a) Campaña 2003. Santiago de Las Vegas.

.Variantes	Largo de la planta (cm)	No de hojas	Diámetro tallo	Diámetro del tubérculo	Superficie (ha)	Rendimiento t/ha
Control	21.35 b	9.56 b	3.59 b	5.10 b	2.0	27.81 b
Inoculado	27.59 a	12.57 a	4.83 a	7.46 a	1.87	41.75 a
Esx	0.34	1.8	0.21	0.11	-	0.72
CV (%)	7.58	3.35	3.20	2.27	-	11.03

Nota: Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con $P < 5\%$.

b) Campaña 2004. Santiago de Las Vegas

Variantes	Altura	No de hojas	Diámetro tallo	Diámetro del tubérculo	Superficie (ha)	Rendimiento t/ha
Control	23.48 b	8.70 b	3.51 b	6.01 b	3.0	29.32 b
Inoculado	31.10 a	13.15 a	4.90 a	8.16 a	2.7	43.96 a
Esx	0.10	1.6	0.30	0.17		0.60
CV (%)	6.40	4.00	4.15	3.29		15.10

Nota: Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con $P < 5\%$.

El rendimiento agrícola, se incrementó en 51 y 48% para los años 2003 y 2004, respectivamente. En el caso de este indicador si se manifiesta un mayor índice de aumento en comparación con la etapa experimental, fenómeno este que ocurre normalmente cuando se escalan nuevas variantes experimentales a condiciones de producción. En trabajos realizados en Brasil con la interacción *Gluconacetobacter diazotrophicus*-*Ipomea batatas* Lam no se describen pruebas que alcancen la superficie que aquí se reporta, aunque si coincide el efecto que produce el microorganismo sobre el cultivo (Dobereiner *et al.*, 1993; Paula *et al.*, 1993).

En el cultivo de la yuca, la altura de la planta, el número de ramas primarias, el diámetro del tallo y el diámetro promedio de las raíces cosechadas por planta se incrementó en 31.96, 87 y 52%, respectivamente, cuando se inoculó la bacteria en relación con las plantaciones controles sin tratar (tabla 6).

Tabla 6. Efecto del biofertilizante ACESTIM sobre el cultivo de la yuca cultivada sobre suelo Ferralítico Rojo (CMC-40).

Campaña 2002-2003 Santiago de las Vegas.

Variantes	Altura planta (cm)	No de ramas primarias	Diámetro tallo	Diámetro Raíz	Rendimiento T/ha
Control	2.10 b	2.65 b	2.71 b	3.84 b	31.19 b
Inoculado	2.76 a	5.15 a	5.10 a	5.85 a	52.64 a
Esx	0.12	0.90	0.19	0.12	1.06
CV (%)	4.56	2.31	2.28	2.22	11.19

Nota: Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con $p < 5\%$.

No obstante, los indicadores de estimulación encontrados al aplicar la bacteria se muestran generalmente superiores a los obtenidos al aplicar otras rizobacterias ya que se debe recordar que independientemente de la cantidad y tipos de sustancias activas que sea capaz de sintetizar la bacteria en cuestión, el efecto de estas sustancias es muy notable en el caso del endófito, ya que no ocurren pérdidas en el suelo rizosférico o por la propia competencia de las rizobacterias (inmovilización de compuestos) en la zona rizosférica, a diferencia de las bacterias asociativas que, como se conoce, pierden más del 50% de su actividad anabólica por estas y otras causas (Dibut, 2000).

En cuanto a la colonización de *G.diazotrophicus*, en este ensayo se obtuvo una concentración de 4.2×10^4 células por gramo de tejido fresco en hojas provenientes de plantas controles y de 3.1×10^7 células en hojas muestreadas a partir de plantas biofertilizadas, o sea, se incrementó 1000 veces el número de células del endófito, obteniéndose un efecto estimulador marcado sobre el crecimiento y el rendimiento del cultivo.

Al aplicar el biopreparado sobre el cultivo de la malanga en dos campañas (2002-2004) en la misma localidad de Santiago de Las Vegas, se observó un efecto beneficioso marcado sobre el desarrollo y el rendimiento de esta especie. Así, en el primer año de prueba de extensión se incrementó el rendimiento agrícola en 40 %, con la obtención de 11t/ha adicionales a favor de la bacterización con *Gluconacetobacter diazotrophicus*. En este caso el largo y diámetro de los tubérculos aumentó en 94 y 58 %, respectivamente, en relación a las plantas provenientes de los campos controles donde no se aplicó el bioproducto (tabla 7).

Tabla 7. Efecto del ACESTIM sobre el cultivo de la malanga cultivada bajo condiciones de producción sobre suelo Ferralítico Rojo (Clon México 1) 2002-2003, Güira de Melena.

Variante	Diámetro del tubérculo (cm)	Largo del tubérculo (cm)	Rendimiento(t/ha)
Testigo	3.89 b	6.75 b	28.95 b
Inoculado	6.15 a	13.10 a	40.70 a
Esx	0.96	0.617	1.04
CV (%)	6.70	20.21	11.15

Nota: Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con $p < 5\%$.

Estos resultados igualmente constituyen un primer reporte la relación al efecto del endófito sobre la malanga. Los valores de rendimiento aquí obtenidos son muy

superiores a los alcanzados bajo condiciones experimentales, lo cual es de esperar teniendo en cuenta el manejo del cultivo bajo condiciones de extensión agrícola, a pesar de que se atendieron de forma esmerada estas plantaciones. Aunque no se muestran datos de crecimiento y desarrollo en etapas intermedias del cultivo, si es necesario señalar que en todo momento el desarrollo de las plantaciones inoculadas fue muy superior al de las plantaciones testigos; algo de mucho interés por parte de los productores resultó ser el cierre de las plantaciones en un tiempo menor (entre 5-8 días antes) lo que contribuyó sobremedida a un menor enyerbamiento, que en el caso de este cultivo resulta importante, ya que la mayoría de las labores de limpia se realizan de forma manual, contribuyendo así de forma sostenible a la economía del cultivo.

CONCLUSIONES

El efecto beneficioso de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre las especies estudiadas demuestra la capacidad de intercambio metabólico planta-microorganismo y la factibilidad técnico-comercial de introducir un nuevo biofertilizante y bioestimulador en la agricultura convencional y urbana.

BIBLIOGRAFIA

1. Dibut Álvarez, B. (2000). Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa* L.). *Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas.*, La Habana, p. 104.
2. Döbereiner, J., V.M. Reis, M.A. Paula and F. Olivares (1993): Endophytic diatrotrop in sugarcane, cereals and tuber plant. In: *New horizons in nitrogen Fixation*, 2. Palacio, P., J. Mora and W.E. Newton (eds) Kluwer Academic Publiher. Dordrecht the Netherlands. Pp. 671-676.
3. Dibut, Bernardo. (2004). INIFAT. Laboratorio de Fermentadores. Comunicación personal.
4. Hallman, J; A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee y J.W. Kloepper. (1997). Bacterial endophytes in agriculture crpos. *Review Synthese. Can. J. Microb.* 43:895-914.
5. Instituto de Suelos (2000): Nueva versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba, Ed AGROINFOR, La Habana, 64 pp,
6. Lambrecht, M., Okon, Y., A. Vande Broek, and j. Vanderleyden. (2000). Indol 3 acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacterial-plant interactions. *Trends in Microbiology.* 8:298-300.
7. Loganathan, P., R. Sunlta., A.k. Parlda, and S. Nair. (1999). Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant Eleusine coracana L. *J. Appl. Microbiol.* 87: 167-172.
8. Ministerio de La Agricultura (1999): Instructivo técnico para el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.), AGRINFOR, Ed., La Habana, 53 pp.
9. Ministerio de la Agricultura (2000): Evaluación de los resultados de año 1999-9. Grupo de Cultivo Varios, Ciudad de la Habana, 17 pp.
10. Paula, M.A. J.O. Siqueira and J. Dobereiner (1993): Ocurrencia de fungor micorrizicos vesiculo-arbusculares e de bacterias diazotróficas na cultura da batatadocc. *Revista Brasileria de Ciencia do Solo* 17(3): 349-35.
11. Reis-Junior, F.B.; L.G. da Silva, V.M. Reis; J. Doberiner; F.B dos Reis Junior y L.G. da Silva. Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugar cane genotypes. *Pes. Agrop. Bras*, 35(5): 985-994, 2000.
12. Riggs, P.J.; M.K. Chehius; A.L. Iniguez; S.M. Kaeppher y E.W. Triblett. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust.J.Plant. Physiology*, 28 (9): 829-836, 2001.
13. Stephan, M.P., M. Oliveira,, K.R.S. Teixeira., G. Martínez-Drets, and J. Döbereiner. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetoabcter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:67-72.