

DIVERSIDAD DE BACTERIAS ASOCIADAS AL FRIJOL COMÚN Y SU POTENCIAL DE USO EN LA AGRICULTURA

Diversity of bacteria associated with common bean and its potential for use in agriculture

 Yoania Ríos Rocafull^{1*},  Maydelín Dorado Bermúdez²,  Bernardo Dibut Álvarez³,
 Marisol Morales Díaz⁴,  Marisel Ortega García⁵

¹Departamento de Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", (INIFAT). Calle 188 No. 38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, Boyeros, La Habana, Cuba. E-mail: dpagrobiotec@inifat.co.cu

²Departamento Recursos Fitogenéticos y Semillas, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", (INIFAT). La Habana, Cuba. E-mail: fisiologiac@inifat.co.cu

³Departamento de Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", (INIFAT). La Habana, Cuba. E-mail: biofertilizantes@inifat.co.cu

⁴Departamento de Recursos Fitogenéticos y Semillas, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", (INIFAT). La Habana, Cuba. E-mail: agroecosistemas@inifat.co.cu

⁵Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", (INIFAT). La Habana, Cuba. E-mail: dir_cientifica@inifat.co.cu

RESUMEN: El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de alta demanda en América. En muchos países utilizan como parte de su manejo agronómico a las bacterias promotoras del crecimiento. Estos microorganismos activan diferentes mecanismos que elevan la productividad de las plantas. Uno de las más estudiadas por la estrecha relación que establecen con las leguminosas son los rizobios. Sin embargo, existen otras bacterias cuya aplicación también puede provocar efectos positivos en este cultivo. Con el objetivo de explotar de una forma más eficiente el microbioma asociado al frijol común, en el presente estudio se aislaron bacterias desde el interior de la planta, los nódulos y la rizosfera de 10 accesiones y cinco variedades comerciales. Se evaluó en condiciones *in vitro* el potencial para fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar nutrientes y tolerar estrés por sequía y salinidad a 18 de los aislados. De forma general, se comprobó que existe variabilidad en las bacterias asociadas a este cultivo, no solo en número sino en las características morfo-fisiológicas y el potencial para estimular el crecimiento, principalmente para solubilizar nutrientes. Aunque los aislados seleccionados crecieron en presencia de PEG 6000 y concentraciones de un 3% de NaCl, se destacaron tres microorganismos procedentes de variedades comerciales, por tolerar estas condiciones de estrés abiótico. La investigación demostró la diversidad de microorganismos que se asocian a este cultivo y su potencial como estimuladores del crecimiento, elemento que puede ser útil para obtener nuevos biofertilizantes para la especie vegetal.

Palabras clave: granos, microbioma, variabilidad.

*Correspondencia a: dpagrobiotec@inifat.co.cu

Recibido: 13/02/2024

Aceptado: 02/05/2024

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de autores: Yoania Ríos Rocafull: **Conceptualización. Curación de datos. Análisis formal. Adquisición de financiamiento. Investigación. Metodología. Escritura - borrador original. Escritura - revisión y edición.** Maydelín Dorado Bermúdez: **Conceptualización. Financiamiento.** Bernardo Dibut Álvarez: **Revisión.** Marisol Morales Díaz: **Curación de datos. Investigación.** Marisel Ortega García: **Curación de datos. Investigación. Metodología. Revisión.**



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



ABSTRACT: Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) have a big demand in America. Different countries use plant growth promoting bacteria in its agronomic management. These microorganisms activate different mechanisms to increase plant productivity. One of microorganisms more studied for the relation with legumes are rizobios. Nevertheless, there are other bacteria that could have a positive effect in this vegetable species. With the aim to use with more efficiency common bean microbiome, in the present study were isolated bacteria from inside the plant, nodules, and rhizosphere of 10 accessions and five commercial varieties. It was evaluated over *in vitro* conditions the potential to fix atmospheric nitrogen, to solubilize nutrients and to resist abiotic stress conditions for 18 bacteria. In general, it was demonstrated the existence of different bacteria associated to this vegetable species in number, morpho-physiological characteristics and potential to plant growth promotion, mainly to nutrient solubilization. Although select microorganisms growth in presence of PEG 6000 and 3 % of NaCl, it was important the behavior of three of them associated with commercial varieties by its tolerance to abiotic stress conditions. The research shows the microbial diversity associated with common beans and its potential as plant growth promoters, an important element to obtain new biofertilizers for this vegetable species.

Key words: grain, microbiome, variability.

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existe un grupo de microorganismos que estimulan el crecimiento vegetal mediante la activación de distintos mecanismos. Se destacan dentro de ellos, la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la solubilización de nutrientes minerales, la producción de fitohormonas y el efecto contra organismos fitopatógenos. Las bacterias con estas características se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB según sus siglas en inglés). Pueden habitar en la rizosfera o en el interior de las plantas y agrupan a géneros como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, entre otros (Velasco et al., 2020).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más valoradas para la alimentación humana por su contenido de proteínas, fibra vegetal, carbohidratos y minerales (Tamayo-Aguilar et al., 2020). En Cuba, se realizan grandes esfuerzos para incrementar sus rendimientos, que en los últimos años ha oscilado entre 0,89 y 1 t.ha⁻¹, siendo insuficiente para cubrir la demanda del grano por parte de la población. La mayor parte de la producción de frijol en el país se desarrolla en el sector no estatal (ONEI, 2021), en pequeñas fincas ubicadas en zonas periurbanas. Para ello, utilizan sistemas tradicionales de bajos insumos que tienen una alta dependencia de las precipitaciones y presentan dificultades para el riego, por lo que las alternativas que contribuyan a elevar su productividad bajo esas condiciones son de vital importancia.

Para estimular el crecimiento de las leguminosas se utilizan desde el pasado siglo los rizobios, microorganismos que establecen una eficiente asociación con este tipo de plantas. Sin embargo, géneros como *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus* también pueden asociarse a esos cultivos y contribuir a elevar sus rendimientos, e incluso, ejercer un efecto positivo en el establecimiento y desempeño de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Valero-Valero et al., 2021). Con el objetivo de explorar el microbioma asociado al frijol común se realizaron aislamientos de bacterias desde el interior de las plantas, los nódulos y la rizosfera de 10 accesiones y cinco variedades inscritas en Cuba. Además, se determinó, para un grupo de microorganismos seleccionados por sus características morfo-fisiológicas, su potencial para fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar nutrientes y tolerar condiciones de estrés abiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de los microorganismos

En el estudio se utilizaron semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de las accesiones 'P-3309', 'P-3613', 'P-3334', 'P-3797', 'P-3785', 'P-3796', 'P-3737', 'P-3289', 'P-3609' y 'P-3697', colectadas en las reservas de biosfera Sierra del Rosario y Cuchillas del Toa y las variedades: 'Milagro Villareño', 'Wacuto', 'Lewa', 'Cuba C25-9-R' y 'Rayado 2285', registradas en el Listado Oficial de Variedades (GOC-2022-1043-0113). En todos los casos, el material vegetal fue proporcionado por el Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", INIFAT.

Las semillas se sembraron en macetas plásticas de 3 kg de capacidad, con suelo Ferralítico Rojo Lixiviado Compactado, Gléyico y Nodular Ferruginoso (Hernández *et al.*, 2015) de áreas agrícolas de la propia institución, cuyas características se muestran en la Tabla 1.

El cultivo se mantuvo con riego diario y se dio seguimiento a su estado sanitario. A los 30 días después de la siembra, se extrajeron las plantas para proceder al aislamiento de las bacterias que se encontraban en el suelo rizosférico asociado a éstas, en su interior y en los nódulos. Para el aislamiento de las bacterias rizosféricas se tomaron 10 g de suelo de la zona más cercana de las raíces de diez plantas, los que se adicionaron en 90 mL de agua destilada estéril para posteriormente realizar sucesivas diluciones seriadas (Madigan *et al.*, 2018). De las diluciones 3 y 4 se tomaron 0,1 mL que se inocularon por diseminación en los medios de cultivo Agar Nutriente (BIOGEN), Asbhy y NFB (citados por Martínez *et al.*, 2006).

El aislamiento de los microorganismos endófitos se realizó a partir de fragmentos de aproximadamente 2 cm² de raíces, tallos y hojas de las plantas, que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4 % y se maceraron, según el procedimiento descrito por Loganathan *et al.* (1999). La savia extraída se inoculó en el medio de cultivo LGI (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Para el caso del aislamiento de microorganismos desde el interior de los nódulos, éstos se separaron de las raíces, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4 %, se maceraron y su contenido se inoculó en el medio de cultivo YMA (citado por Martínez *et al.*, 2006).

Todas las placas *Petri* inoculadas se incubaron a 30 °C de temperatura durante 48 h, periodo que se extendió a cinco días para los medios de cultivo NFB y LGI. Todos los microorganismos se purificaron a partir de siembras por agotamiento en el mismo medio que se utilizó para su aislamiento. Una vez completada esta etapa de

trabajo, se seleccionaron los aislados semejantes a los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*, para lo que se realizó una caracterización morfo-fisiológica de los microorganismos mediante métodos convencionales. Se determinó la morfología (cultural y celular), la respuesta a la tinción de Gram, la presencia de enzimas (catalasa y citocromo oxidasa), la motilidad, el uso de citrato como fuente de carbono, el crecimiento en medio Kliger y la actividad amilásica (hidrólisis del almidón) (Harrigan y Mc Cance, 1968).

En el caso de los microorganismos purificados en el medio YMA se adicionó la evaluación de la coloración de las colonias en este medio de cultivo con Rojo Congo; para los aislados procedentes del medio LGI se comprobó su crecimiento en concentraciones de sacarosa y de glucosa del 30 % y para los microorganismos purificados en el medio NFB se determinó su coloración en el medio de cultivo Rojo Congo de *Azospirillum* (citado por Martínez *et al.* 2006).

De los aislados crecidos en el medio Agar Nutriente se obtuvo una suspensión celular en agua destilada estéril que se colocó a 100 °C de temperatura durante 20 min. y posteriormente, se inocularon 0,1 mL de la solución en el mismo medio de cultivo, seleccionando las bacterias que crecieron después de 48 h de incubación a 30 °C de temperatura.

Caracterización de los microorganismos seleccionados por su potencial como promotores del crecimiento vegetal

A los aislados seleccionados por sus características morfo-fisiológicas se les evaluó su potencial como promotores del crecimiento vegetal. Se determinó su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico a partir de su crecimiento en el medio de cultivo Asbhy carente de nitrógeno combinado y su potencial para solubilizar nutrientes por la formación de un halo de solubilización alrededor de la colonia bacteriana

Tabla 1. Características del suelo utilizado para la siembra del germoplasma de frijol común para el aislamiento de los microorganismos asociados

pH	Materia orgánica (%)	P ₂ O ₅	K ₂ O	K	Na	Ca	Mg
		mg.100g		Cmol.kg			
7,50	1,67	62,50	31,60	0,67	0,10	22,50	5,50

Métodos de análisis: pH (potenciometría); materia orgánica (Walkley y Black); P₂O₅ (Oniani, por extracción con H₂SO₄); K₂O (por cálculo a partir del potasio intercambiable); K, Na (fotometría de llama); Ca y Mg (espectrofotometría de absorción atómica).

crecida en el medio de cultivo Pikovskaya (citado por Martínez *et al.*, 2006) con fosfato de calcio, de hierro y de aluminio y una modificación de este medio con fuentes de potasio (Guevara, 2010). En todos los casos la incubación se realizó a 30 °C de temperatura, durante 72 h.

Caracterización de los microorganismos seleccionados por su tolerancia a condiciones de estrés abiótico

Los microorganismos se caracterizaron además, por su tolerancia a condiciones de salinidad y sequía. Para el primer caso, los aislados se inocularon en el medio de cultivo utilizado para su aislamiento, al que se le adicionaron de manera independiente diferentes concentraciones de NaCl (0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 % y 10 %) y se midió el diámetro de la colonia a las 24 y 48 h de incubación a una temperatura de 30 °C. Para simular las condiciones de sequía se utilizaron distintas concentraciones de PEG 6000 (0,1 %, 1 %, 3 %, 5 % y 10 %) en el medio de cultivo Caldo Nutriente (BIOCEN). A las 48 h de incubación, a la misma temperatura anteriormente referida, se observó la turbidez del medio y se comparó con un control sin inocular. Se estableció una escala cualitativa donde se consideró el crecimiento de la bacteria como:

- +: Abundante crecimiento
- +/-: poco crecimiento
- : no presencia de crecimiento.

Todas las pruebas se realizaron con un diseño Completamente Aleatorizado. En los ensayos con resultados cuantitativos estos se expresaron con su valor promedio y la desviación estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la rizosfera, los nódulos y el interior de las plantas de las 10 accesiones y las cinco variedades de frijol común que se utilizaron en el estudio se purificaron 140 microorganismos. La mayor contribución en los aislamientos la realizó el ambiente rizosférico, siendo muy similar el porcentaje de microorganismos procedentes del interior de la planta y de los nódulos (Figura 1).

La rizosfera se considera una interface dinámica. Es regulada por la planta y las condiciones ambientales, pero aun así en ella conviven una gran cantidad de microorganismos,

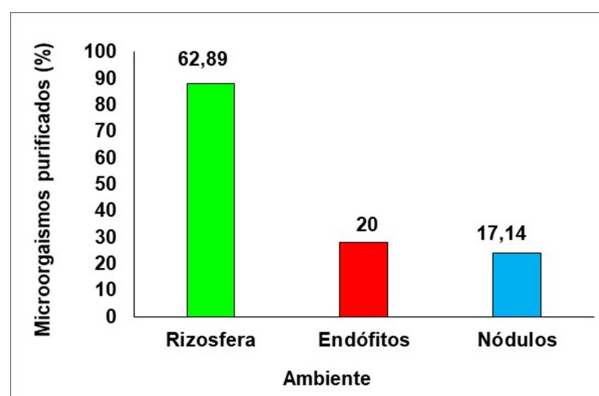


Figura 1. Cantidad de microorganismos aislados desde nódulos, rizosfera y plantas de diferentes accesiones y variedades inscritas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

por lo que la diversidad filogenética y funcional en este ambiente tiene una alta complejidad (Bonilla *et al.*, 2021). Autores como Ahmad *et al.* (2016), comentaron en sus estudios que de forma general el interior de las plantas tiene un menor número de microorganismos, debido a la presión selectiva que ejerce el cultivo durante el proceso de colonización. No obstante, se debe señalar que en el caso del presente estudio el aislamiento de un mayor número de bacterias desde la rizosfera de las plantas de frijol también puede estar relacionada con la metodología de trabajo, ya que la cuantificación en este caso se realizó en tres de los cinco medios de cultivo utilizados (Asbhy, Agar Nutriente y NFB), en tanto para el ambiente endófito y los nódulos solamente se utilizó uno (LGI y YMA, respectivamente).

Las accesiones de frijol se destacaron como fuente de procedencia de microorganismos, ya que a excepción de 'P3697', de las restantes se purificaron entre 10 y 15 aislados bacterianos, agrupándose en cinco de estos materiales genéticos ('P3309', 'P3609', 'P3613', 'P3796' y 'P3334') aproximadamente el 50 % de los aislamientos realizados (Figura 2). Estos materiales proceden de fincas de productores de reservas de la biosfera (Sierra del Rosario y Cuchillas del Toa), lugares de referencia como ambientes conservados y donde se promueve la presencia de una alta biodiversidad de plantas que influye también en los microorganismos que a ellas se asocian. Ello puede ser relevante en la selección de nuevas cepas microbianas con alto potencial para la promoción del crecimiento vegetal.

De los 140 microorganismos purificados se seleccionaron 18 que presentaron en los medios de cultivo Asbhy, NFB y YMA características

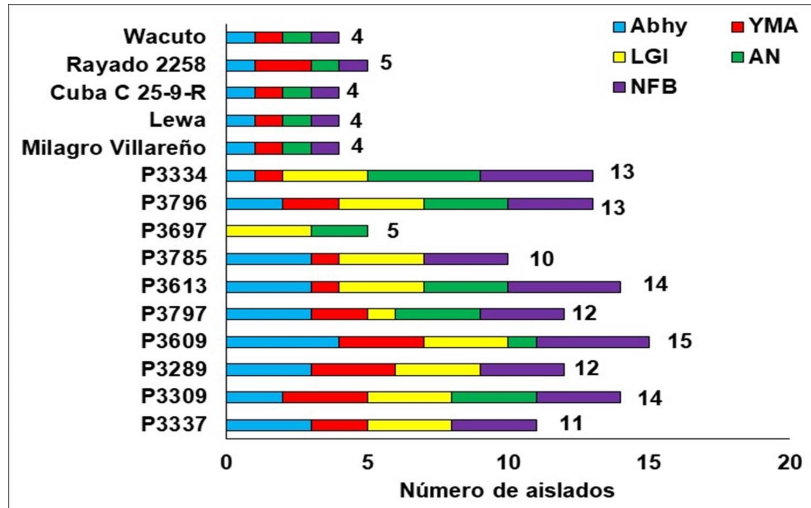


Figura 2. Distribución por material vegetal y medios de cultivo de los microorganismos aislados desde nódulos, rizosfera y plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

morfológicas similares a las descritas para los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*, respectivamente. La morfología de las colonias, las células y la respuesta a la Tinción de Gram de estas bacterias se muestra en la [Tabla 2](#).

En el interior de las plantas existen diferentes grupos microbianos, aun cuando esta ejerce una presión selectiva en los microorganismos ([Rodríguez et al., 2021](#)). Ello explica por qué se aislaron bacterias endófitas en el medio de cultivo LGI que no presentaron las características distintivas del género *Gluconacetobacter*, específicamente su coloración amarillo intensa-naranja y su respuesta

negativa a la tinción de Gram ([Cavalcante y Döbereiner, 1988](#)), aunque se debe destacar que hasta el momento el frijol común no se refiere dentro de los hospederos de esta bacteria.

Dentro de los nódulos de las leguminosas también se describe la presencia de una comunidad microbiana diversa ([Martínez et al., 2020](#)), con representantes de otros órdenes como Enterobacteriales, Pseudomonales y la subclase β Proteobacteria ([Bonilla et al., 2021](#)). Ello justifica que de los 24 microorganismos aislados en el medio de cultivo YMA solamente dos presentaron características morfo-fisiológicas similares al género *Rhizobium*. Los restantes absorbieron el

Tabla 2. Características morfológicas y tintoriales de bacterias aisladas desde los nódulos y la rizosfera de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) seleccionadas por su similitud con géneros promotores del crecimiento vegetal

Medio de cultivo de aislamiento	Aislados	Características culturales	Respuesta a la Tinción de Gram
YMA	'P3337' 'P3613'	Colonias en el medio YMA circulares, con bordes enteros, elevación convexa y consistencia mucosa. Color rosa en el medio con Rojo Congo y amarillas en el medio con Bromotimol Azul	Bacilo Gram negativo
Asbhy	'P3613'; 'P3309' T1; 'P3309' T2; 'P3289'; 'Milagro Villareño'; 'Lewa' y 'Cuba C25-9-R'	Colonias en el medio Asbhy circulares, con bordes enteros, elevación convexa y consistencia mucosa. Color beige.	Bacilo corto Gram negativo
	'Rayado 2258' 'P3609'	Colonias en el medio Asbhy circulares, con bordes enteros, elevación convexa y consistencia mucosa. Traslúcidas	Bacilo corto Gram negativo
NFB	'P3334'; 'Lewa'; 'Wacuto'; 'P3609' y 'Cuba C25-9-R'	Colonias puntiforme, con bordes enteros, elevación plana, secas, blancas en el medio NFB y rojo escarlata en el medio con Rojo Congo	Bacilo corto Gram negativo
	'Milagro Villareño' y Rayado 2258'	Colonias circulares, con bordes enteros, elevación convexa, secas, blancas en el medio NFB y rojo escarlata en el medio con Rojo Congo	Bacilo corto Gram negativo

colorante Rojo Congo o fermentaron la lactosa. Este medio de cultivo el género *Rhizobium*, que agrupa a bacterias Gram negativas, presenta colonias de cremas a traslúcidas, generalmente mucosas, con bordes enteros, elevación que varía de plana a elevada en el medio YMA, que no absorben el Rojo Congo (Alcarráz et al., 2020). Este grupo taxonómico presentan las enzimas catalasa y citocromo oxidasa, utiliza el citrato como fuente de carbono, como los dos aislados seleccionados.

De las 29 bacterias aisladas en el medio de cultivo Asbhy se seleccionaron 10, por su morfología. Estas presentaron colonias circulares, con bordes enteros y traslúcidas o beige, con células como bacilos Gram negativos, tal y como describió Alcarráz et al. (2020) para el género *Azotobacter*. Estos aislados presentaron además, una respuesta positiva para las pruebas de oxidasa y catalasa, como en los estudios de Corrales et al. (2020) para cepas de este género bacteriano. Por su parte, de los microorganismos purificados en el medio de cultivo NFB se seleccionaron siete, cuya morfología y fisiología coincidió con las descripciones del género *Azospirillum*. Según Moreno y Galvis (2020), esta forma de colonias blancas en el medio NFB, tiene una respuesta positiva a la prueba de la oxidasa, y se distingue por sus colonias rojo escarlata en el medio de cultivo Rojo Congo (Martínez et al., 2006).

En el caso del medio de cultivo Agar Nutriente, que se utilizó con el objetivo de aislar microorganismos con posibilidades de pertenecer al género *Bacillus*, aunque se logró la purificación de diferentes aislados ninguno formó esporas que le permitieran resistir el procesamiento de la muestra (100 °C de temperatura durante 20 min). Este resultado no es contradictorio, pues en los estudios realizados por Pérez et al. (2020) de 437 aislados solamente el 32 % se correspondió con bacilos esporulados Gram positivos, por lo que su proporción no tiene que ser necesariamente tan elevada como para alcanzar siempre resultados positivos en el aislamiento de este tipo de microorganismos.

De forma general, a partir de la siembra de las muestras del interior de las plantas, los nódulos y la rizosfera de diferentes accesiones y variedades comerciales de frijol en diferentes medios de cultivo, se demostró la posible presencia de varios

grupos de bacterias con marcadas diferencias morfo-fisiológicas. Tanto el género *Rhizobium*, como los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* se reconocen como promotores del crecimiento vegetal (Velasco et al., 2020), por lo que podrían ejercer un efecto positivo en interacción con el cultivo.

Los 18 microorganismos seleccionados por sus características similares a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium* mostraron diferencias en su potencial como posibles estimuladores del crecimiento vegetal, otro indicador de la diversidad microbiana que se asocia al cultivo del frijol común. Se destacaron como aspectos positivos presentes en todos los aislados la potencialidad para fijar nitrógeno atmosférico, aunque destacó también que cerca del 50 % de ellos toleró condiciones de sequía inducida con PEG 6000 y salinidad (Figura 3), aspecto positivo para su uso en la formulación de nuevos productos que mantengan su efectividad bajo las actuales condiciones de cambio climático.

La Tabla 3 muestra los mecanismos directos de estimulación del crecimiento que presentó cada uno de los aislados. Nótese que todos crecieron en el medio de cultivo carente de nitrógeno combinado, lo cual indica que podrían fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, ninguno de los microorganismos solubilizó fosfato de hierro o de aluminio. En cuanto a la solubilización de fosfato de calcio se destacaron cuatro aislados, aunque uno de ellos, asociado en el aislamiento del cultivar 'Wacuto', fue el único que solubilizó también potasio.

Bonilla et al. (2021) destacaron en su revisión el potencial como fijadores de nitrógeno atmosférico de los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, pues existen referencias del potencial solubilizador de fosfatos de estos géneros bacterianos, aunque se destaca que los resultados dependen de la cepa en estudio, más que del género al cual pertenecen. La solubilización de potasio ha sido menos abordada para las bacterias promotoras del crecimiento. En particular para el género *Azospirillum* al cual se asoció el aislado F21 por sus características morfo-fisiológicas, no se encontraron referencias sobre este atributo metabólico, por lo que este es un aspecto en el cual se deberá profundizar en estudios posteriores.

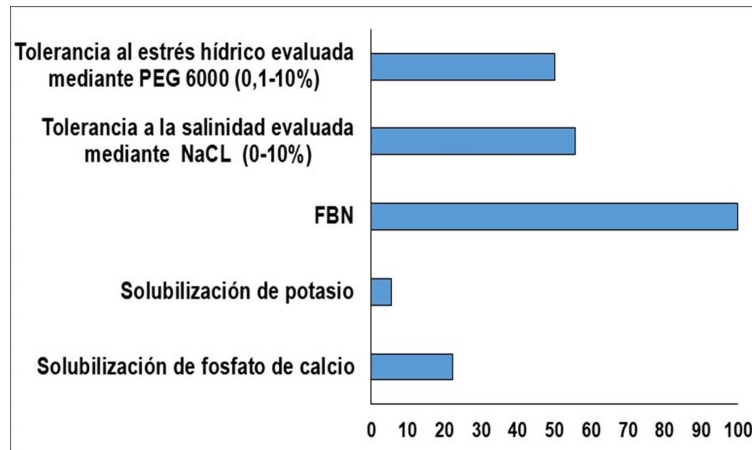


Figura 3. Características favorables para la estimulación del crecimiento vegetal presente en bacterias aisladas desde los nódulos y la rizosfera de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (el eje de las abscisas expresa el porcentaje del total de aislados)

Tabla 3. Presencia de características promotoras del crecimiento en bacterias aisladas desde los nódulos y la rizosfera de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Medio de cultivo de aislamiento	Código asignado al microorganismo	Cultivar al que está asociado	Solubilización				Fijación Biológica de Nitrógeno
			Ca	Fe	Al	K	
YMA	F1	'P3337'	-	-	-	-	+
	F7	'P3613'	-	-	-	-	+
Asbhy	F8	'P3613'	-	-	-	-	+
	F9	'P3309 T1'	-	-	-	-	+
	F10	'P3309 T2'	-	-	-	-	+
	F11	'P 3289'	-	-	-	-	+
	F12	'Milagro Villareño'	-	-	-	-	+
	F13	'P3609'	-	-	-	-	+
	F14	'Lewa'	-	-	-	-	+
	F15	'Cuba C25-9-R'	-	-	-	-	+
	F16	'Rayado 2258'	-	-	-	-	+
	F19	'P3334'	-	-	-	-	+
NFB	F20	'Milagro Villareño'	+	-	-	-	+
	F21	'Wacuto'	+	-	-	+	+
	F22	'P3609'	+	-	-	-	+
	F23	'Rayado 2258'	+	-	-	-	+
	F24	'Lewa'	-	-	-	-	+
	F25	'Cuba C25-9-R'	-	-	-	-	+

Todos los microorganismos crecieron en presencia de un 3 % de NaCl a las 24 h de incubación. Al aumentar la concentración de sal disminuyó el número de aislados con resultados positivos (resultados positivos para 15 aislados para la concentración de 5 % y para tres (F14, F15 y F21) para la concentración de 10 %). Sin embargo, a las 72 h de incubación solamente el aislado F9 no creció a la concentración del 5 %, aspecto que denota que después de un periodo de adaptación todos estos microorganismos toleran la presencia de NaCl. Destacaron los aislados F12, F14 y F15 purificados en el medio de cultivo Asbhy

y el F21 procedente del NFB por su tolerancia a la máxima concentración de NaCl utilizada en el estudio desde las 24 h de incubación (Figura 4).

Resultó un aspecto de interés que en los aislados con menor tolerancia al NaCl se modificó la morfología de la colonia al aumentar la concentración de sal, particularmente su consistencia, la que pasó de gomosa a seca (Figura 5). Ello sugiere que la producción de exopolisacáridos podría ser uno de los mecanismos implicados en la tolerancia de las bacterias a esta condición de estrés.

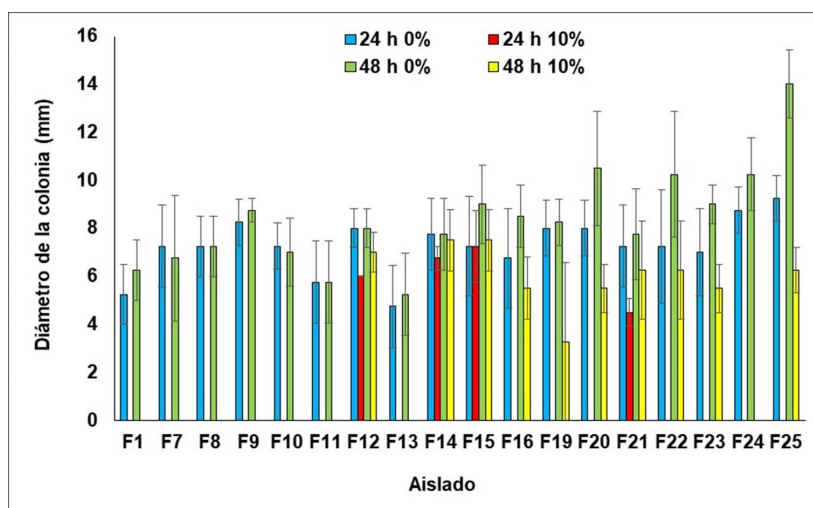


Figura 4. Diámetro de las colonias de bacterias aisladas desde nódulos y la rizosfera de frijol común en presencia de dos concentraciones de NaCl (concentración mínima y máxima utilizada en el estudio). En las barras se indica el valor de la desviación estándar de la media

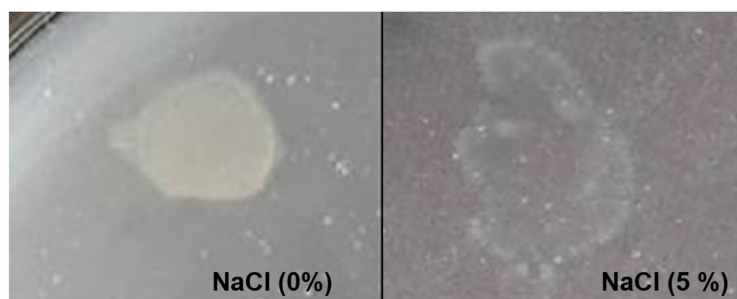


Figura 5. Colonias del aislado F9 procedente de la rizosfera de la accesión P-3309 de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sembrada en suelo Ferralítico Rojo. (Medio de cultivo Asbhy con diferentes concentraciones de NaCl)

Todos los aislados crecieron en el medio de cultivo con PEG 6000, incluso a la concentración más alta que se utilizó en el estudio (10 %) (Tabla 4). Se destacaron 10 microorganismos que mostraron un crecimiento abundante en presencia de 3 % de PEG 6000, de ellos cuatro aislados en el medio de cultivo Asbhy y los restantes en el medio NFB. Repitieron con resultados relevantes los tres que mostraron mayor tolerancia a condiciones de salinidad (F14, F15 y F21), lo que sugiere que presentan varios mecanismos de adaptación al estrés ambiental.

La adaptación de los microorganismos a condiciones de estrés requiere de la modificación de su metabolismo. Una de las herramientas que utilizan ante estrés de sequía y salinidad es la acumulación de solutos compatibles. Actualmente, una de las estrategias que se proponen para contrarrestar los efectos negativos que provocan estas condiciones de estrés a los cultivos es el uso de microorganismos que, además de adaptarse a estos cambios, estimulen el crecimiento vegetal.

Estas bacterias, de forma general, sobreviven tanto a condiciones de sequía como de salinidad, temperaturas extremas y contaminación por metales. En interacción con los cultivos activan mecanismos como la liberación de fitohormonas (en especial ácido indol acético), la síntesis de enzimas como la ACC desaminasa que reduce los niveles de etileno en la planta, regulan la concentración de iones intracelulares y sintetizan solutos compatibles, los que contribuyen a que el vegetal presente una mayor tolerancia al estrés.

Dentro de los géneros bacterianos que toleran condiciones de sequía y salinidad se destacan *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium* y *Azospirillum* (Bonilla et al., 2021). Para ellos se describe como mecanismo principal de tolerancia la acumulación de solutos compatibles, aunque en algunos casos también se refiere la contribución de los exopolisacáridos que estas bacterias producen, la formación de biopelículas, la solubilización de nutrientes, la producción de sideróforos, la síntesis de antibióticos, así como la regulación de genes asociados al estrés (Guevara et al., 2020).

Tabla 4. Crecimiento de las cepas de bacterias promotoras del crecimiento asociadas a germoplasma de frijol común, en presencia de PEG 6000

Medio de cultivo de aislamiento	Código asignado al microorganismo	Cultivar al que está asociado	Concentraciones de PEG 6000 (%)				
			0,1	1	3	5	10
YMA	F1	'P3337'	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F7	'P3613'	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F8	'P3613'	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F9	'P3309' T1	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F10	'P3309' T2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F11	'P3289'	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F12	'Milagro Villareño'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	F13	'P3609'	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F14	'Lewa'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	F15	'Cuba C25-9-R'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
NFB	F16	'Rayado 2258'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	F19	'P3334'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	F20	'Milagro Villareño'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	F21	'Wacuto'	+/-	+	+	+/-	+/-
	F22	'P3609'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	F23	'Rayado 2258'	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	F24	'Lewa'	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	F25	'Cuba C25-9-R'	+/-	+/-	+	+/-	+/-

+/-: poco crecimiento; +: crecimiento abundante.

El género *Azotobacter* en particular, se destaca por formar quistes, estructuras que le brindan tolerancia a condiciones ambientales adversas, mientras que para los rizobios, aunque se plantea que tienen susceptibilidad a la salinidad, especies como *Rhizobium* y *Sonirrhizobium* pueden tolerar altas concentraciones de NaCl, a partir de la acumulación de compuestos como la trealosa y el glutamato (Bonilla *et al.*, 2021).

El estudio demostró que la diversidad asociada a las plantas de frijol común no solo está en función de la morfología de los microorganismos, sino de su potencial como estimuladores del crecimiento vegetal y su tolerancia a condiciones de estrés abiótico, por lo que su microbioma constituye un reservorio de agentes potenciales para lograr potenciar el crecimiento y el rendimiento de este cultivo y elevar su productividad en Cuba.

CONCLUSIONES

Asociado al frijol común existe una comunidad microbiana diversa donde se encuentran bacterias similares en morfología a los géneros *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Azospirillum*, con características promotoras del crecimiento vegetal y tolerancia a condiciones de estrés abiótico, que podrían contribuir la base de nuevas estrategias para potenciar los rendimientos de esta especie vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PN211LH009-006 "Identificación de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) con tolerancia a la sequía" que se ejecutó en el Programa Nacional Cambio Climático en Cuba: Impactos, Mitigación y Adaptación por financiar la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmad, I.; Altaf. M.M.; Sharma, J. y Al-Thubiani, A.S. (2016). Diversity, quorum sensing and plant growth promotion by endophytic diazotrophs associated with sugarcane with special reference to *Gluconacetobacter diazotrophicus* Chapter 23. En: Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture. DK Choudrury *et al.* (eds). Springer Nature Singapore Pte Ltd. 495-509. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854_23.
- Alcarraz, M.; González, E. y Heredia, V. (2020). *Azotobacter* y *Rhizobium* como biofertilizantes naturales en semillas y plantas de frijol caupí. Avances. 22 (2): 239-251. Disponible en: <http://www.ciget.pinar.cu/ojs/index.php/publicaciones/article/view/538/1610>
- Bonilla, R.; González, L.E. y Osvaldo, R. (2021). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible. Corporación colombiana de investigación

- agropecuaria – Mosquera (Colombia): AGROSAVIA. Editorial Agrosavia. 327 p. ISBN E-book: 978-958-740-501-9. ISBN: 978-958-740-500-2. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7405019>
- Cavalcante, V.A y Döbereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*; 108: 23–31. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>.
- Corrales, M.; Lumbres, V.; Iglesia, S. y Carreño, C. (2020). Potencialidades de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, aisladas de *Portulaca oleracea* L. en suelos con salinidad. *Pastos y Forrajes*. 43:93-101. *Versión On-line* ISSN: 2078-8452.
- GOC-2022-1043-O113. (2022). Gaceta Oficial de la República de Cuba. Resolución 183/2022. 3326-3358. 17 de noviembre del 2022. Disponible en: <http://www.gacetaoficial.gob.cu>.
- Guevara, J.; Arroyo, I.; Bahena, Y.; Román, B. y Vásquez, M.S. (2020). Suelos salinos: fuente de microorganismos halófilos asociados a plantas y resistentes a metales. *Alianzas y Tendencias – BUAP*. 5 (17): 29-51. *ISSN*: 2594-0627.
- Guevara, M.F. (2010). Aislamiento e identificación de microorganismos solubilizadores de Potasio a partir de muestras de suelo y raíces de cultivos de alcachofa de la localidad de la Remonta, Cañón Cayambe. Tesis en opción al Título de Ingeniera en Biotecnología. Sangolquí. Julio 2010. 86 p. Disponible en: <http://www.repositorio.espe.edu.ec>.
- Harrigan, W.F y Mc Cance, M. (1968). *Métodos de Laboratorio de Microbiología*. (ed.) Academia, España. ISBN: 84-7000-034-9.
- Hernández, A.; Pérez, J.M.; Bosch, D. y Castro, N. (2015). Clasificación de los suelos de Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Instituto de Suelos. Ediciones INCA. 92 pp. ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Loganathan, P.; Sunitha, R.; Parida, A.K. y Nair, S. (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.
- Madigan, M.T.; Bender, K.S.; Buckley, D.H.; Sattley, W.M. y Stahl, D.A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*. Fifteenth Edition. Global Edition. 1058 p. ISBN: 07-0-13-426192-8.
- Martínez, V.R.; López, M.; Brossard, F.M.; Tejeda, 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, Serie B, No. 11. 88 p.
- Martínez, V.; Medina, R.; Gauna, J.M. y Balatti, P.A. (2020). Bacterial endophytes diversity of tree legumes from Argentina. *Agrociencia Uruguay*. Disponible en: <http://agrocienciauruguay.uy/ojs/index.php/agrocien-cia/article/view/411>.
- Moreno, L.Y. y Galvis, F. (2020). Identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a *Lycopersicon esculentum* Mill en el Norte de Santander, Colombia. *Agrociencia*, 54 (7): 843-857. *ISSN*: 2521-9766. Disponible en: <http://www.colpos.mx/agrocien/agrociencia.htm>.
- ONEI (2021). Anuario Estadístico de Cuba. 2020. Capítulo 9. Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca. 4-35. Oficina Nacional de Estadística e Información. Edición 2021. Disponible en: www.onei.gob.cu.
- Pérez, Y.; Rondón, A.J.; Fuentes, L.; Nápoles, M.C.; Martínez, M.M y Rubio, Y. (2020). Rizosfera de tres cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. fuente de bacterias formadoras de endosporas con potencial biotecnológico. *Biología Vegetal*. 20 (4): 313–325. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu>.
- Rodríguez, C.A.; Ricardo, L.; Pérez, B. y Nelly, Z. (2021). Bacterias y hongos endófitos de la familia Cactaceae y sus aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 24: 1-14. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.328>.
- Tamayo-Aguilar, Y.; Juárez-López, P.; Capdevila-Bueno, W.; Lescaille-Acosta, J. y Terry-Alfonso, E. (2020). Bioproductos en el crecimiento y rendimiento de *Phaseolus vulgaris* L. var. Delicia 364. *Terra Latinoamericana Número Especial*. 38-3: 667-678. Disponible en: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.672>.
- Valero-Valero, N.O.; Vergel-Castro, C.M.; Ustate, Y. y Gómez-Gómez, L.C. (2021). Bioestimulación de frijol guajiro y su simbiosis con *Rhizobium* por ácidos húmicos y *Bacillus mycoides*. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(2): 119-134. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1608>.
- Velasco, A.; Castellanos, O.; Acevedo, G.; Clarenc, R. y Rodríguez, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*. 38: 333-345. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>.