



ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica

*Diversity of associative diazotrophic bacteria and potential use in economic important crops*

Yeised de la Fe Pérez<sup>a</sup>, Acela Díaz de la Osa<sup>a</sup>, Gloria María Restrepo-Franco<sup>b</sup>, Vera Lucia Diván-Baldani<sup>c</sup> y Annia Hernández-Rodríguez<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

<sup>b</sup> Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, Grupo de Investigaciones Biológicas de la Universidad Católica de Manizales, Caldas, Colombia.

<sup>c</sup> Laboratorio de Gramíneas. EMBRAPA Agrobiología. Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil

\* Autor para correspondencia:  
[annia@fbio.uh.cu](mailto:annia@fbio.uh.cu)

### RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo ofrecer una panorámica actual acerca de las bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de importancia económica haciendo énfasis en su diversidad, los métodos para su aislamiento y clasificación, así como en sus potencialidades de uso como inoculantes microbianos. Las bacterias diazotróficas asociativas han sido identificadas en numerosos géneros de alfa- y beta-proteobacterias. Los métodos utilizados para el estudio de su diversidad incluyen el crecimiento en medios de cultivos selectivos, la determinación del perfil fisiológico de las comunidades microbianas y los métodos moleculares. Las bacterias diazotróficas, además del aporte de nitrógeno que hacen a través de la Fijación Biológica, pueden promover de forma directa el crecimiento de las plantas mediante otros mecanismos de acción. La producción masiva y aplicación de biofertilizantes requiere de investigaciones básicas que abarcan desde la microbiología, la ecología y la biología molecular.

**Palabras clave:** bacterias diazotróficas asociativas, aislamiento, fijación biológica del nitrógeno, cultivos de importancia económica

### ABSTRACT

*This work aims to provide a current overview about associated diazotrophic bacteria with economically important crops, emphasizing on their diversity, methods for isolation and classification, as well as their potential use as microbial inoculants. Diazotrophic associative bacteria belong to numerous genera of alpha- and beta-proteobacteria. The methods used for studying the diversity of associative diazotrophs include: the inoculation on selective*

Recibido: 2014-10-08

Aceptado: 2015-01-12

*growth media, physiological profile of microbial communities and molecular methods. The diazotrophic bacteria, in addition to the nitrogen contribution made through biological fixation, can directly promote the growth of plants by other mechanisms of action. The production and application of bio-fertilizers requires basic research, ranging from microbiology, ecology and molecular biology.*

**Keywords:** diazotrophic associative bacteria, isolation procedure, biological nitrogen fixation, economic important crops

## INTRODUCCIÓN

La rizosfera constituye un ambiente favorable para el desarrollo de microorganismos en cantidades superiores a las encontradas en el resto del suelo. Esta porción del suelo presenta una alta concentración de nutrientes ya que las plantas liberan sustancias carbonadas, vitaminas y sustratos específicos que constituyen una fuente importante de energía para los microorganismos circundantes. También segregan sustancias antimicrobianas volátiles y difusibles e inhibidores de moléculas señales (Quorum sensing (QS)) que regulan el tamaño de la población y la expresión de genes en base a la densidad celular (Hartman *et al.*, 2009; Okusa *et al.*, 2014). A su vez, los microorganismos solubilizan minerales, fijan nitrógeno atmosférico, promueven el crecimiento vegetal y estimulan respuestas de defensa que protegen a las plantas ante el ataque de patógenos. También compiten por nutrientes y producen fitotoxinas y aleloquímicos que inhiben el crecimiento de las plantas hospedantes.

Se estima que hasta el 40% de los fotosintatos producidos por la planta son exudados al ambiente rizosférico (Lynch y Whipps, 1990), ejerciendo una acción selectiva sobre las poblaciones microbianas asociadas a las plantas (Hartman *et al.*, 2009). La diversidad microbiana también varía con la edad de la planta y la presencia de microorganismos patógenos en la rizosfera (Morgan, Bending, White, 2005). Doornbos *et al.* (2012), en estudios realizados en pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pimiento (*Capsicum annum* L.), demostraron que en suelos distintos, la composición microbiana de la rizosfera era diferente para cada especie vegetal, pero similar entre las plantas de una misma especie.

Las bacterias que habitan en la rizosfera pueden ser aisladas e inoculadas en los cultivos ejerciendo un efecto positivo sobre las plantas. Diversos grupos funcionales se han utilizado con el objetivo de promover el crecimiento vegetal con impactos en la producción sostenible de alimentos. Dentro de estos, se encuentran las bacterias diazotróficas que desempeñan un

papel fundamental en la fijación biológica de nitrógeno (FBN), que constituye el mayor aporte biológico de nitrógeno a la biosfera y una fuente esencial para el desarrollo de ecosistemas agrícolas sostenibles (Pedraza *et al.* 2010). Están representadas por diversos grupos filogenéticos que pueden vivir libres, establecer simbiosis o estar asociadas a las plantas (Souza Moreira *et al.*, 2010). Este trabajo tiene como objetivo ofrecer una panorámica actual acerca de las bacterias diazotróficas asociadas a cultivos de importancia económica haciendo énfasis en su diversidad, los métodos para su aislamiento y clasificación, así como en sus potencialidades de uso como inoculantes microbianos.

### Generalidades de la fijación biológica del nitrógeno

Las bacterias que fijan nitrógeno se clasifican como bacterias diazotróficas simbióticas y asociativas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014). Dentro de las simbióticas se incluyen los miembros de la familia Rhizobiaceae que establecen simbiosis con plantas leguminosas y a los actinomicetos del género *Frankia* que establecen simbiosis con plantas no leguminosas (Santi *et al.*, 2013).

En la FBN la conversión de dinitrógeno ( $N_2$ ) a amoníaco ( $NH_3$ ) está catalizado por la enzima nitrogenasa, un complejo de metaloproteínas con características estructurales y mecánicas altamente conservadas. Este complejo enzimático es una combinación de dos proteínas solubles, conocidas como Molibdeno-hierro (MoFe) e hierro (Fe), de acuerdo a sus propiedades metálicas (Ahemat y Kribet, 2014).

El proceso involucra alrededor de 200 kb de ADN que codifican para todas las proteínas necesarias en su ensamblaje y funcionamiento. La expresión de los genes que codifican para el complejo nitrogenasa está fuertemente regulada, desde la transcripción hasta las modificaciones post-transcripcionales de la proteína (Kim *et al.*, 1999). La dinitrogenasa o proteína Hierro-molibdeno, contiene el sitio activo para la reducción del  $N_2$ , tiene peso molecular de alrededor 250

kDa y se constituye por dos heterodímeros, codificados por los genes *nifD* y *nifK* (Rees *et al.*, 2005). La dinitrogenasa reductasa o proteína Hierro (alrededor 70 kDa), une la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) a la transferencia de electrones y está formada por dos subunidades idénticas codificadas por el gen *nifH*. En la mayoría de las nitrogenasas conocidas están presentes centros Fe-S en ambos componentes proteicos y se unen por la presencia del Mo. Existen nitrogenasas “alternativas” que reemplazan el Mo con vanadio (V) codificados por gen *vnfH*, o que reemplaza el Mo con Fe codificado por *anfH* (Barney *et al.*, 2006).

La FBN es un proceso altamente dependiente de ATP al consumir aproximadamente 16 moléculas por mol de N<sub>2</sub> reducido. Este alto costo energético conlleva a los microorganismos a inactivar la enzima cuando está disponible el nitrógeno combinado; evitando un gasto energético innecesario, en correspondencia con el principio de economía celular (Baldani *et al.*, 2014).

Varios factores ambientales influyen sobre la FBN incluyendo la humedad del suelo, la presencia de dióxígeno (O<sub>2</sub>), el pH, la cantidad y calidad de carbono, la disponibilidad de nitrógeno y elementos trazas (hierro (Fe), Molibdeno (Mo), fósforo (P) y vanadio (V)) (Dixon y Kahn, 2004). Incrementos en la humedad del suelo unido a baja tensión de O<sub>2</sub>, generalmente aumentan la FBN, mientras que en suelos con bajo pH este proceso no se ve favorecido.

### Bacterias diazotróficas asociativas: métodos de aislamiento e identificación

Las bacterias diazotróficas asociativas se encuentran muy estrechamente asociadas a la plantas e incluyen bacterias de vida libre y endófitas (Ahemat y Kribet, 2014). Se ubican en diferentes géneros como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter* y *Serratia* (Ahemat y Kribet, 2014).

La frontera entre las bacterias diazotróficas asociativas es difusa, ya que se han encontrado bacterias asociativas en el interior de la planta, aunque en mucha menor abundancia que las clasificadas como endófitas (Ahemat y Kribet, 2014). Las endófitas tienen ventaja sobre las asociativas ya que colonizan el interior de la planta y establecen su nicho en condiciones más apropiadas para la fijación efectiva de nitrógeno y su transferencia a la planta hospedante.

Las bacterias diazotróficas asociativas se aíslan del interior y la superficie de diferentes partes del vegetal (Figura 2). Para ello se utilizan medios selectivos que tienen como principal característica la ausencia de formas combinadas de nitrógeno (Baldani *et al.*, 2014), limitando el crecimiento de las bacterias que no tienen esta capacidad. Por ejemplo, en el medio NFb crece *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum* (Döbereiner and Day, 1976), *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001), *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989), *A.*



**Figura 1.** Procesamiento de muestras. A: muestras colectadas; B: secado del material vegetal y separación de parte aérea y raíz; C: mezcla de las muestras con solución salina (NaCl 0.85%) y maceración para siembra en medios semisólidos

Figure 1. Samples processing. A: collected samples; B: dried of vegetal material and separation of aerial parts and roots; C: mixture of samples with saline solution (NaCl 0.85%) and maceration for sowing in semisolid media.

*melinis* (Peng *et al.*, 2006) y *Azoarcus olearus* (Chen *et al.*, 2013). En medio LGI, *A. amazonense* (Baldani, 1984). En medio JNFb, *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1992), *H. frisingense* (Kirchhof *et al.*, 2001), *H. rubrisubalbicans* (Baldani *et al.*, 1996) y *Sphingomonas spp.* (Videira *et al.*, 2009). En medio LGI-P, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante and Döbereiner, 1988, Reis *et al.*, 1994), *G. johanna* y *G. azotocaptans* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001). En medio JMV, *Burkholderia kururiensis* (Baldani *et al.*, 2000), *Burkholderia tropica* (Reis *et al.*, 2004) y *Burkholderia silvatlantica* (Perin *et al.*, 2006).

Se debe tener en cuenta la fuente de inóculo porque al proceder estos aislados de suelo o fragmentos de hojas, tallos y raíces (Fig. 1), tienen pequeñas cantidades de nitrógeno combinado que permitirá el crecimiento de aislados no fijadores de nitrógeno. Para lograr aislar verdaderos diazótrofos se recomienda realizar una segunda siembra de los aislados a medio libre de nitrógeno de forma que solo sobrevivan los que tengan la capacidad de vivir a expensas del nitrógeno fijado.

Los diazótrofos asociativos pueden ser aerobios o microaerófilos, por lo que la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo es otra característica importante a tener en cuenta para su aislamiento. Para la detección de diazótrofos aeróbicos se pueden utilizar medios de cultivo sólidos y líquidos. Estos microorganismos tienen diferentes estrategias para proteger la enzima nitrogenasa del O<sub>2</sub> y evitar que esta se dañe de forma irreversible (Dixon y Kahn, 2004).

Los medios de cultivo más utilizados para la detección de diazotróficos microaerófilos son de consistencia semi-sólida, en los que se propicia un gradiente de oxígeno adecuado para que las poblaciones se sitúen en sitios donde la concentración de oxígeno sea suficiente para la respiración microbiana y sin excesos que afecten la enzima nitrogenasa (Souza-Moreira *et al.*, 2010). Es importante destacar que en la medida que las bacterias se multiplican y su densidad aumenta, la película se mueve en dirección hacia la superficie donde existe mayor cantidad de oxígeno disponible.

Las condiciones físico químicas óptimas de crecimiento de cada especie bacteriana, tales como fuente de carbono, pH y temperatura, también se deben tener en cuenta para el aislamiento (Döbereiner *et al.*, 1995). De esta forma se logra favorecer el crecimiento de diazotróficos y se limita el crecimiento de otros contaminantes.

Los métodos que se utilizan para el estudio de la diversidad de diazotróficos asociativos incluyen el crecimiento en medios de cultivos selectivos (Döbereiner *et al.*, 1995), técnicas dependientes del cultivo que incluyen el perfil fisiológico de las comunidades microbianas (Pérez *et al.*, 2009), y métodos moleculares que, junto con la bioinformática y los análisis estadísticos, son considerados herramientas valiosas para estudios de caracterización y estructura de las comunidades microbianas en diferentes ambientes (Nocker *et al.*, 2007).

Para determinar el perfil fisiológico han sido utilizados métodos que permiten evaluar la diversidad metabólica potencial de comunidades microbianas en diferentes ambientes. Estos incluyen esquemas de identificación bioquímicos en extensas bases de datos que asocian los parámetros bioquímicos con la identidad de las especies microbianas. Entre estos paneles de pruebas se encuentran el Índice de Perfil Analítico (según sus siglas en inglés, API, Analytical Profile Index) (O'Hara, 2005) y el sistema BIOLOG (BIOLOG Inc., USA) (Stefanowicz, 2006). Los sistemas API son sistemas de identificación que asocian una galería bioquímica miniaturizada con una extensa base de datos (O'Hara, 2005). El sistema BIOLOG permite la identificación de los microorganismos mediante la producción de un patrón metabólico único, independiente del crecimiento microbiano, debido a la presencia de colorante del tipo tetrazolio, que al producirse la asimilación del sustrato cambia de incoloro a violeta (Stefanowicz, 2006).

Las técnicas moleculares más comúnmente empleadas para la identificación de bacterias diazotróficas son: la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S y la hibridación de ADN *in situ* (Tindall *et al.*, 2010). Si en cambio, se necesita determinar la diversidad de especies diazotróficas que pueda encontrarse colonizando una planta, se realiza el análisis de restricción del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S empleando las enzimas *MspI* y *RsaI* (Mocali *et al.*, 2003). El análisis filogenético de las secuencias de este gen ofrece alta resolución y permite la generación de datos para la identificación de especies o la determinación de porcentajes de identidad con especies conocidas mediante la comparación con secuencias depositadas en las bases de datos internacionales (Nocker *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso de genes concatenados, tales como *nifH*, *rpoD* y *gyrB*, permite la reconstrucción de árboles filogenéticos con mayor veracidad (Ramette *et al.*, 2011).

En la actualidad las tendencias de la taxonomía bacteriana apuntan hacia un mayor protagonismo de las técnicas genómicas que han permitido el surgimiento de una nueva técnica, el análisis de identidad de nucleótidos (ANI, según inglés, Average Nucleotide Identity), haciendo corresponder el 70% de similitud en la hibridación ADN-ADN con un 94% de ANI. Esta nueva técnica se ha propuesto como un buen candidato que podría ser utilizado en sustitución de la hibridación ADN-ADN (Rosselló-Móra, 2012), por lo que su aplicación, junto a estudios de taxonomía polifásica serían de gran utilidad para delimitar la ubicación taxonómica de las bacterias diazotróficas asociativas con efectos benéficos sobre las plantas.

#### Diversidad taxonómica y funcional de las bacterias diazotróficas

Las bacterias diazotróficas asociativas han sido identificadas en numerosos géneros de alfa- y beta-proteobacterias incluyendo *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea* sp. y *Sphingomonas* en arroz (*Oryza sativa* L.) (Baldani et al., 2000; Verma et al., 2004; Videira et al., 2009; Estrada et al., 2013; Baldani et al., 2014). En maíz (*Zea mays* L.) se destacan los géneros *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Dobbelaere et al., 2001; Shaharona et al., 2006), mientras que en trigo (*Triticum aestivum* L.), diversos autores informan la presencia de *Herbaspirillum*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Boddey et al., 1986). En 2012, Ambrosini et al., plantearon que los géneros *Enterobacter*, *Burkholderia* y *Klebsiella* son predominantes en la asociación

con las raíces de girasol (*Helianthus annuus* L.) con independencia del tipo de suelo y de la región geográfica donde es cultivado.

Las especies *Azospirillum brasiliense* y *A. lipoferum* han sido las más estudiadas, detectándose su presencia abundante en arroz, maíz, trigo, café (*Coffea arábica* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Döbereiner y Pedrosa, 1987). *Gluconacetobacter diazotrophicus* ha sido aislado en piña (*Ananas comosus* L. Merr), calabaza (*Cucurbita moschata* Duch y Poir), maíz, papaya (*Carica papaya* L.), remolacha (*Beta vulgaris*, L.), zanahoria (*Daucus carota* D.C.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Dibut et al., 2009, Restrepo-Franco et al., 2015). *Herbaspirillum seropedicae* se encuentra asociado a los cultivos de arroz y sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) (Baldani et al., 1986). Asimismo, *Burkholderia vietnamiensis* se encuentra asociada al cultivo del arroz (Gillis et al., 1995), *B. kururiensis* (syn. *B. brasiliensis*) a arroz, yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y caña de azúcar (Baldani et al., 1997); *B. tropica* (syn. *B. tropicalis*) a caña de azúcar y maíz (Reis et al., 2004). Otras bacterias diazotróficas aisladas de caña de azúcar son las especies *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *Pantoea* sp. (Boddey et al., 2003; Loiret et al., 2004).

La cantidad y diversidad de bacterias diazotróficas también varía entre cultivares de una misma especie vegetal (Souza Moreira et al., 2010). En estudios desarrollados en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana con diferentes cultivares de arroz y utili-

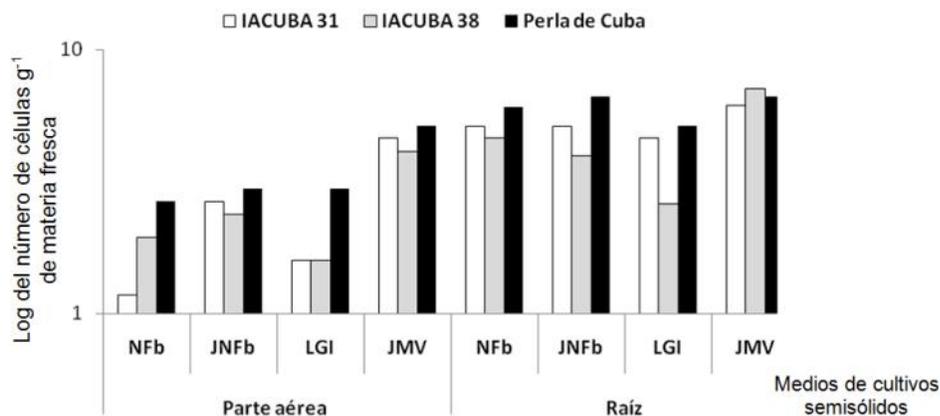


Figura 2. Número de bacterias diazotróficas en cultivares cubanos de arroz de 30 días de edad.

Figure 2. Number of diazotrophic bacteria in rice cuban cultivars on 30-days-old-plants

zando medios selectivos, el tamaño de la población de bacterias diazotróficas colonizando las plantas varió de 1,18 a 7,15 bacterias por gramo de tejido fresco. El número de bacterias diazotróficas fue más elevado en las raíces de las plantas que en la parte aérea, observándose diferencias en el número total de bacterias entre ambos hábitat (Figura 2). De modo general, el cultivar Perla de Cuba presentó los mayores números de bacterias diazotróficas, tanto en la raíz como en la parte aérea, en comparación con los otros dos cultivares, lo que se puede deber a una mayor especificidad entre las bacterias y los exudados radicales de la planta, lográndose una interacción planta-bacteria más específica.

Las bacterias diazotróficas, además del aporte de nitrógeno que hacen a través de la Fijación Biológica (FBN), pueden promover de forma directa el crecimiento de las plantas mediante otros mecanismos de acción. Estos efectos directos incluyen la solubilización de minerales, síntesis de fitohormonas y absorción de elementos minerales, debido a incrementos en los flujos iónicos de la superficie de las raíces (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

Diferentes autores demostraron que los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pantoea*, *Herbaspirillum* y *Erwinia* tienen la capacidad de solubilizar fosfato (Estrada *et al.*, 2013; Restrepo-Franco *et al.*, 2015). Sus principales mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos orgánicos, la quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y la asimilación directa de fosfatos insolubles, lo que está relacionado con la fuente de P disponible.

La producción de fitohormonas por parte de las bacterias y su impacto en la morfogénesis de la raíz, podrían explicar en gran parte los efectos positivos de las bacterias diazotróficas en el crecimiento vegetal (Pedraza *et al.*, 2010). Al incrementarse el número de pelos radicales y raíces laterales, existe mayor absorción de agua y nutrientes por la planta y un mayor intercambio con el ambiente de la rizosfera, lo que contribuye a incrementos en el rendimiento del cultivo.

Las bacterias diazotróficas asociativas también pueden mitigar los efectos nocivos ocasionados por plagas en cultivos de importancia económica, lo que denota sus potencialidades de uso en el manejo integrado de los cultivos. Hernández-Rodríguez *et al.* (2014),

demonstraron que con la aplicación de bacterias diazotróficas como inoculantes microbianos en el cultivo del arroz se disminuye el uso de productos químicos nitrogenados y con ello las afectaciones producidas por *Pyricularia oryzae*.

#### **Promoción del crecimiento vegetal por bacterias diazotróficas asociativas: potencialidades de uso**

Los beneficios en el crecimiento y rendimiento de las cosechas luego de la aplicación de diferentes géneros diazotróficos ha sido ampliamente discutida en la bibliografía (Ahemat y Kribet, 2014; Santi *et al.*, 2013; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014). Existe una amplia variedad de métodos y parámetros para documentar la contribución de los microorganismos nitrofixadores a los cultivos (Tabla 1).

Brasil, pionero en las investigaciones de los microorganismos diazotrófos asociativos y endófitos, cuenta con Masterfix gramínea, inoculante a base de *Azospirillum lipoferum* recomendado principalmente para maíz y trigo (Rives *et al.*, 2007). En Colombia, el grupo conformado por el Laboratorio de Fermentaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), la empresa privada Biocultivos S.A. y la Federación Nacional del Arroceros (Fedearroz) cuentan con biofertilizantes, tales como Dimazos<sup>®</sup> y Fosfosol<sup>®</sup> que se ha comprobado que incrementan el rendimiento de cultivos de importancia agrícola, fundamentalmente del arroz (Echeverri y Castillo, 2008). Asimismo, es conocida la presencia en Europa (Lipha, Francia) de un producto a partir de *Azospirillum* con el que se han obtenido buenos resultados en cultivos agrícolas (Döbbelaere *et al.*, 2001).

En Cuba desde finales de la década del 80 se obtuvieron resultados alentadores con la cepa de *Azospirillum brasilense* Sp7 en los cultivos de arroz y caña de azúcar con incrementos en los rendimientos agrícolas (Velazco, 2001). En la actualidad en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) se comercializa un biofertilizante con nombre de registro AzoFert<sup>®</sup> que se elabora a base de cepas de *Azospirillum sp.* (Rives *et al.*, 2007). El Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) también desarrolló una formulación a partir de la cepa autóctona de *Azospirillum* 81 (Rives *et al.*, 2007) con buenos resultados en caña de azúcar.

Asimismo el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), ha desarrollado experimentos de

**Tabla 1.** Efectos de la aplicación de bacterias diazotróficas asociativas en cultivos de importancia económica.

Table 1. Effects of diazotrophic bacteria application in economic important crops.

Cultivo	Inoculante diazotrófico	Incremento	Referencias
Arroz	<i>Azoarcus</i>	16% peso húmedo total <sup>^</sup>	Engelhard <i>et al.</i> , 2000
	<i>Burkholderia</i>	68% biomasa aérea <sup>^</sup> ; 19% masa de semilla <sup>^</sup>	Baldani <i>et al.</i> , 2000
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	30% peso húmedo total <sup>^</sup>	Muthukumarasamy <i>et al.</i> , 2005
	<i>Pantoea agglomerans</i>	64% biomasa total <sup>^</sup>	Feng <i>et al.</i> , 2006
	<i>Azospirillum amazonense</i>	4-19% de N acumulado en grano maduro <sup>^</sup>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2008
	<i>Bacillus</i> sp. <i>Paenibacillus</i> sp. <i>H. seropedicae</i> (H18, ZA15, and ZAE 94), <i>B. vietnamiensis</i> (AR114), <i>G. diazotrophicus</i> (PAL5), <i>A. chroococcum</i> (Ac1)	Incrementos en el crecimiento de raíces y tallos 33 to 47 % producción de semillas <sup>^</sup>	Beneduzi <i>et al.</i> , 2008 Estrada <i>et al.</i> , 2012
Maíz	<i>Serratia marcescens</i>	23 % peso húmedo total <sup>^</sup>	Gyaneshwar <i>et al.</i> , 2001
	<i>H. seropedicae</i>	49-82% biomasa total <sup>^</sup>	Riggs <i>et al.</i> , 2001
	<i>Pseudomonas putida</i> R-168, <i>P. fluorescens</i> R-93, <i>P. fluorescens</i> DSM 50090, <i>P. putida</i> DSM291, <i>Azospirillum lipoferum</i> DSM 1691, <i>Azospirillum brasilense</i> DSM 1690	Incremento en altura de la planta y peso húmedo del tallo*	Gholami <i>et al.</i> , 2009
	<i>Enterobacter sakazakii</i> 8MR5, <i>P. sp.</i> 4MKS8, <i>Klebsiella oxytoca</i> 10MKR7	Incremento de los parámetros de crecimiento vegetal*	Babalola <i>et al.</i> 2003
	<i>Azospirillum brasilense</i>	33% producción de semillas*	Dobbelaere <i>et al.</i> , 2001
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	19-50% biomasa de la planta <sup>^</sup>	Suman <i>et al.</i> , 2007
Caña de azúcar	<i>H. seropedicae</i> , <i>H. rubrisubalbicans</i>	35% materia húmeda <sup>^</sup>	Oliveira <i>et al.</i> , 2002
	<i>Klebsiella sp.</i> GR9	13-20% biomasa*	Govindarajan <i>et al.</i> , 2007
Trigo	<i>H. seropedicae</i>	49-82% biomasa total <sup>^</sup>	Riggs <i>et al.</i> 2001

<sup>^</sup> Experimentos en condiciones controladas

\* Experimentos en condiciones de campo

campo con la especie *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia agrícola (Dibut *et al.*, 2009). Estos bioproductos en sus diferentes presentaciones (líquida y polvo) pueden aplicarse de forma directa en el suelo o recubriendo las semilla de los cultivos (Terry *et al.*, 2005, Rives *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque existe una gran variedad de microorganismos caracterizados y evaluados en campo, son pocos los productos comerciales que se ofrecen a los productores. Comportamiento que está relacionado con las limitaciones, desde la fabricación hasta la comercialización de los biofertilizantes, para la obtención de productos bacterianos consistentes, seguros y eficaces.

La producción masiva y aplicación de biofertilizantes requiere de investigaciones básicas que abarcan desde la microbiología, la biología molecular, la biología hasta la ecología. En primer lugar es básico la selección de una cepa estable y con potencialidades, la

factibilidad de su producción masiva con insumos locales, y los parámetros y condiciones de su aplicación. Existen otros aspectos de vital importancia como la calidad de los productos, la obtención de formulaciones competitivas, la efectividad técnica y la reducción de los costos económicos, así como los beneficios ecológicos y sociales.

## CONCLUSIONES

Las bacterias diazotróficas asociativas aportan nitrógeno a la planta a través de la FBN promoviendo el crecimiento y rendimiento de cultivos de importancia económica, dentro de los que se destacan las gramíneas. Estas bacterias se encuentran representadas en una gran diversidad de grupos filogenéticos, que pueden ser caracterizados utilizando medios semisólidos libres de nitrógeno y taxonomía polifásica. Los géneros más frecuentes son *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Gluconacetobacter*.

Sin embargo, estudios desarrollados a escala de macetas y campo demuestran que los exudados radicales desempeñan un papel fundamental en la selección de los géneros bacterianos presentes en su rizosfera y que estas poblaciones varían con el genotipo, la edad de la planta y las condiciones ambientales. A pesar de las potencialidades de las bacterias diazotróficas, aun son insuficientes los productos comerciales. Estudios para optimizar su reproducción a escala de banco, a nivel industrial, de estabilidad y formulación, permitirán la incorporación de productos factibles que puedan ser utilizados para la producción sostenible de alimentos.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Proyecto CAPES/MES 110/11 «Aplicación de Bacterias diazotróficas promotoras del crecimiento vegetal en la producción sustentable del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)».

#### LITERATURA CITADA

- Ahemad M. y M. Kibret (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King. Saud. Univ. Sci.* 26: 1-20.
- Ambrosini A., A. Beneduzi, T. Stefanski, F.G. Pinheiro, *et al.* (2012) Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356: 245-64.
- Babalola O. O., E. O. Osir, A. Sanni, G. D. Odhaimbo, *et al.* (2003) Amplification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. *African J. Biotech.* 2: 157-160.
- Baldani J. I., V. L. D. Baldani, M. J. A. M. Sampaio y J. Döbereiner (1984) A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *An. Acad. Brasileira Ciên.* 56: 265
- Baldani J. I., V. L. D. Baldani, L. Seldin y J. Döbereiner (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International J. Syst. Bacteriol.* 36: 86-93
- Baldani V. L. D., J. I. Baldani, F. L. Olivares y J. Döbereiner (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 19: 65-73
- Baldani J. I., T. B. Pot, G. Kirchoff, E. Falsen, *et al.* (1996) Emended description of *Herbaspirillum*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb.nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 802-810.
- Baldani J., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi, *et al.* (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29(5): 911-922.
- Baldani V. L. D., J. I. Baldani y J. Döbereiner (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fertility of Soils* 30: 485-491.
- Baldani J.I., V. Massena, S. Sampaio, L.H. Boddey, *et al.* (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil.* 384: 413-431.
- Barney B.M., H.I. Lee, P.C. Dos Santos, B.M. Hoffman, *et al.* (2006) Breaking the N<sub>2</sub> triple bond: insights into the nitrogenase mechanism. *Dalton Transactions*: 2277-2284.
- Beneduzi A., D. Peres, L.K. Vargas, M.H. Bodanese-Zanettini, *et al.* (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing Bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39: 311-320.
- Boddey R.M., S. Urquiaga, B.J. Alves y V. Reis (2003) Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil* 252(1): 139-149.
- Boddey R.M., V.L.D. Baldani, J.I. Baldani y J. Döbereiner (1986) Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil* 95: 109-121.
- Cavalcante V. y J. Döbereiner (1988) A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar-cane. *Plant Soil* 108: 23-31
- Chen M.H., S.Y. Sheu, E.K. James, C.C. Young, *et al.* (2013) *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3755-3761
- Dibut B, R. Martínez-Viera, M. Ortega, Y. Ríos y G. Tejada (2009) Situación actual y perspectiva de las relaciones endófitas planta - bacteria. Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus* - cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales* 30(4):16-23.
- Dixon R y D. Kahn (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 621-631.
- Dobbelaere S., A. Croonenborghs, A. Thys (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian J. Plant Phys.* 28: 871-879.
- Döbereiner J. y J. M. Day (1976) Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Newton WE, Nyman CJN (Eds.) *Proc 1<sup>st</sup> International Symposium Nitrogen Fixation* Washington: Pullman, Washington State University Press, pp 518-538.
- Döbereiner, J. y F. O. Pedrosa (1987) Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. *Science Tech, Madison, USA.* 155 pp.
- Döbereiner, J. (1995) Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En: Alef K, Nannipieri P (Eds) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry.* Academic San Diego, CA, pp:134-141.
- Doornbos R. F., L. C. V. Loon y P. A. H. M. Bakke (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agron. Sustain. Develop.* 32: 227-243.

- Echeverri R. y A. Castillo (2008) Biofertilizantes como mejoradores del proceso de nutrición del arroz. *Rev. Arroz* 56 (474): 12-27.
- Eckert B., O.B. Weber, G. Kirchhof, A. Halbritter *et al.* (2001) *Azospirillum doebereineræ* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:17-26.
- Engelhard M., T. Hurek y B. Reinhold-Hurek (2000) Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Env. Microbiol.* 2: 131-141.
- Estrada G. A., V. L. D. Baldani, D. M. de Oliveira, S. Urquiaga *et al.* (2013) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil* 369: 115-129.
- Feng Y., D. Shen yW. Song (2006) Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *J. Appl. Microbiol.* 100: 938-945.
- Fuentes-Ramírez L. E., R. Bustillos-Cristales, A. Tapia-Hernandez, T. Jimenez-Salgado, *et al.* (2001) Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannæ* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov. associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1305-1314.
- Gholami A., S. Shahsavani y S. Nezarat (2009) The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *Int. J. Biol. Life Sci.* 1: 35-40.
- Gillis M., T. Van Van, R. Bardin, M. Goor, *et al.* (1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(2): 274-289.
- Govindarajan M., S. W. Kwon y H. Y. Weon (2007) Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. *World J. Microbiol.* 23: 997-1006.
- Gyaneshwar P., E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy *et al.* (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183: 2634-2645.
- Hartmann A., M. Schmid, D. van Tuinen y G. Berg (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil.* 321: 235-257.
- Hernández-Rodríguez A., N. Rives-Rodríguez, Y. Acebo-Guerrero, A. Díaz-de la Osa, *et al.* (2014) Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protec. Veg.* 29(1): 11-19.
- Khammas K. M., E. Ageron, P. A. D. Grimont y P. Kaiser (1989) *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Rev. Microbiol.* 140:679-693.
- Kim H. B. y C. S. An (1997). Nucleotide sequence and expression of *nifHD* from *Frankia* strain EulKI, a symbiont of *Elaeagnus umbellata*. *Physiol. Plantarum*, 99(4): 690-695.
- Kirchhof G., B. Eckert, M. Stoffels, J. I. Baldani, *et al.* (2001) *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fiber plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:157-168
- Klopprogge K, R. Grabbe, M. Hoppert y R. A. Schmitz (2002) Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. *Arch. Microbiol.* 177: 223-34.
- Loiret F. G., E. Ortega, D. Kleiner, P. Ortega-Rodés, *et al.* (2004) A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J. Appl. Microbiol.* 97: 504-511.
- Lynch J. M. y J. M. Whipps (1991) Substrate flow in the rhizosphere. pp15-24. En: D.L. Keister and P.B. Kregan (eds) *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Mocali S., E. Bertelli, C. Di, A. Mengoni, A. Sfalanga *et al.* (2003) Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Res. Microbiol.* 154: 105-114.
- Morgan J. A. W., G. D. Bending y P. J. White (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Botany*, 56 (417):1729-1739
- Muthukumarasamy R., I. Cleenwerck y G. Revathi (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 277-286
- Nocker A., M. Burr y A. Camper (2007) Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microbial Ecol.* 54(2): 276-89.
- O'Hara C. M. (2005) Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 147-162.
- Okusa P. N., T. Rasamiravaka, O. Vandeputte, C. Stévigny *et al.* (2014) Extracts of *Cordia gillettii* de wild (Boraginaceae) quench the quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Inter-cult. Ethnopharmacol.* DOI: 10.5455/jice.20140710031312.
- Oliveira A.L.M., S. Urquiaga, J. Döbereiner y J. I. Baldani (2002) The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micro-propagated sugarcane plants. *Plant Soil* 242: 205-215.
- Pedraza R.O., K. R. S. Teixeira, A. Fernández, I. García, *et al.* (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Rev. Corpoica - Cien. Tecn. Agropec.* 11(2): 155-164.
- Peng G., H. Wang, G. Zhang, W. Hou, *et al.* (2006) *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1263-1271
- Pérez C.A., S.J. Rojas y M.H. Vale (2009) Biología y perspectivas de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Rev. Colomb. Cien. Anim.* 1(2): 286-301.
- Perin L., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, J. I. Baldani, *et al.* (2006) *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1931-1937

- Ramette A., M. Frapoli, M. Fischer-Le Saux, C. Gruffaz, *et al.* (2011) *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 3(3): 180–188.
- Rees D. C., F. Akif, C. A. Haynes, M. Y. Walton, *et al.* (2005) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Phil. Trans. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 363: 971–984
- Reis, V. M. M, F. L. Olivares y J. Döbereiner (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotech.* 10:401–405
- Reis, V. M., P. Estrada-de-Los-Santos, S. Tenório-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, *et al.* (2004) *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2155–2162
- Restrepo-Franco, G. M., S. Marulanda-Moreno, Y. de la Fe-Pérez, A. Díaz-de la Osa, *et al.* (2015) Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* 46(1): 63-76.
- Riggs, P. J., M. K. Chelius, A. L. Iniguez, S. M. Kaeppler, *et al.* (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Austr. J. Plant Physiol.* 28: 829–836.
- Rives N, Y. Acebo y A. Hernández-Rodríguez (2007) Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales* 28(2): 29-38.
- Rodríguez, E. P., L. S. Rodríguez, A. L. M. Oliveira, V. L. D. Baldani, *et al.* (2008) *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 302: 249-61.
- Rosselló-Móra, R. (2012) Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. *Env. Microbiol.* 14: 318-334.
- Santi, C., D. Bogusz, C. Franche (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* 111:743-67
- Shaharoona, B, M. Arshad y Z.A. Zahir (2006) Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiate* L.). *Letters Appl. Microbiol.* 42: 155–159.
- Souza, F. M., K. Da Silva, R. S. Abrahão, F. De Carvalho (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1(2):74-99.
- Stefanowicz, A. (2006) The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Polish J. Env. Studies* 15: 669-676.
- Suman, A., A. Gaur, A.K. Shrivastava, A. Gaur, P. Singh, *et al.* (2007) Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. *Plant Growth Reg.* 54: 1–11.
- Terry, E., A. Leyva y A. Hernández-Rodríguez (2005) Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colomb. Biotech.* VII(002): 47-54.
- Tindall, B.J., R. Rosselló-Mora, H.J. Busse, W. Ludwig, *et al.* (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 249-266.
- Velazco, A. (2001). Utilización de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*) sobre un suelo Hidromórfico Gley de la provincia de Pinar del Río. Tesis de Doctorado. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. p. 128
- Verma S.C., A. Singh, S.P. Chowdhury y A.K. Tripathi (2004) Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechn. Lett.* 26:425-429.
- Videira S. S., J. L. S. Araújo, L. S. Rodrigues, V. L. V. Baldani, J. I. Baldani (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiol. Letter* 293:11–19



**Editor para correspondencia:** Dr. Irina Salgado Bernal