




## ARTÍCULO ORIGINAL

## Caracterización de bacterias diazotróficas solubilizadoras de fosfatos nativas de agroecosistemas arroceros cubanos

*Characterization of phosphate-solubilizing cuban native diazotrophic bacteria from rice ecosystems*

Maybel Almenares-Casanova<sup>1</sup>, Gema Pijeira-Fernández<sup>1</sup>, Yeised de la Fe-Pérez<sup>1</sup>, Gloria M. Restrepo-Franco<sup>2</sup> , Annia Hernández-Rodríguez<sup>1\*</sup> 

### RESUMEN

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial, Grupo de Investigaciones Biológicas de la Universidad Católica de Manizales, Colombia

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

El arroz (*Oryza sativa* L.) constituye uno de los cereales más cultivados en el mundo. En Cuba, la producción nacional no satisface su alta demanda, por lo que el desarrollo de estrategias ecológicas dirigidas hacia el aumento de su rendimiento constituye una prioridad para la agricultura. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar bacterias diazotróficas nativas del cultivo de *O. sativa* en Cuba en cuanto a su capacidad solubilizadora de fosfatos inorgánicos. Se evaluaron treinta aislados para determinar su capacidad solubilizadora de fosfato en medio NBRIP sólido suplementado con tres fuentes de fósforo inorgánico ( $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y ocho de ellos fueron seleccionados para estudios en medio NBRIP líquido. De ellos, dos fueron seleccionados para un bioensayo con plantas de arroz en macetas con suelos suplementados con diferentes fuentes de fósforo inorgánico. Los aislados *Pseudomonas* SN4528 y *Herbaspirillum* RJ1442 tienen la capacidad de solubilizar  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$  y son eficientes en la estimulación del crecimiento vegetal, lo que denota su potencial para ser utilizadas como inoculantes microbianos en beneficio del cultivo de *O. sativa*.

**Palabras clave:** *Oryza sativa* L., *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$

### ABSTRACT

*Rice (Oryza sativa L.) is one of the most cultivated cereals around the world. In Cuba, the production of this cereal cannot meet the high demand does not satisfy the high demand of population, so the development of strategies aimed at increasing its yield is a priority for agriculture. This work aims to characterize native diazotrophic bacteria from O. sativa L. for their ability to solubilize inorganic phosphorus. Thirty isolates were tested for the ability to solubilize inorganic phosphorus on NBRIP plate media with different phosphate sources ( $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) and eight selected strains were further evaluated in NBRIP liquid medium. Two of these isolates were inoculated in rice plants grown in soil pots containing phosphate sources. *Pseudomonas* SN4528 and *Herbaspirillum* RJ1442 solubilize  $\text{FePO}_4$  and  $\text{AlPO}_4$  and are efficient in plant growth. These results suggest that the selection and use of P-solubilizing diazotrophic bacteria are a good strategy in the design of ecologically sustainable strategies in O. sativa.*

**Keywords:** *Oryza sativa* L., *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$

Recibido: 2020-04-21

Aceptado: 2020-06-29

## INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) constituye un cereal imprescindible para la alimentación de dos tercios de la población mundial (Yanni y Dazzo, 2010). Sin embargo, las producciones del grano no cubren la gran demanda mundial debido, entre otras causas, a la gran explosión demográfica en los últimos años, la aparición de plagas, a los cambios climáticos y a los factores tierra y agua que también han sido limitantes (FAO, 2015). En Cuba, el arroz constituye un componente fundamental en la dieta diaria de la población, con un consumo per cápita considerado entre los más altos de América Latina, y que asciende a 60 kg por persona anualmente.

El área sembrada con arroz en Cuba es de aproximadamente 138 455 ha y la producción de arroz destinada al consumo supera las 200 000 toneladas anuales (MINAGRI, 2019). Teniendo en cuenta la importancia que tiene el arroz en la economía mundial y para la alimentación humana, es necesario lograr mayores producciones del cereal sin que esto conlleve al aumento de las aplicaciones de fertilizantes químicos, fundamentalmente nitrogenados, que son excesivamente costosos y poco factibles desde el punto de vista ecológico (FAO, 2015).

Otro de los factores limitantes para el crecimiento vegetal es la concentración de fósforo (P) en el suelo que, aunque oscila entre 100-3000 mg Kg<sup>-1</sup>, solo el 0,1% se encuentra disponible (Zou *et al.*, 1992). Los suelos agrícolas contienen grandes cantidades de P, pero en formas no asimilables para las plantas. Se calcula que el 70% del P inorgánico proviene de la aplicación de agroquímicos y se convierte rápidamente en los complejos insolubles fosfato de calcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), fosfato de aluminio (AlPO<sub>4</sub>) y e ion fosfato (Alam y Ladha, 2004).

Las bacterias diazotróficas asociativas con capacidad para solubilizar diferentes fuentes de P, constituyen una alternativa con el fin de elaborar productos ecológicos que mejoren la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Esto permitiría un mejor aprovechamiento de los mismos por parte de la planta, lo que repercute en la obtención de mayores rendimientos y la conservación del medio ambiente (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2018). Estas bacterias, además de la solubilización de nutrientes (Dash *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2017), pueden promover el crecimiento de las plantas mediante otros mecanismos de acción.

Estos efectos incluyen el aporte de nitrógeno a través de FBN (Roy y Srivastava, 2013), la síntesis de fitohormonas (Pedraza *et al.*, 2010) y su efecto en el control de plagas (Berg, 2009; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2018). El aislamiento y caracterización de cepas nativas asociadas a los cultivos constituye un paso esencial para el desarrollo de inoculantes microbianos (Kalayu, 2019).

Aunque las potencialidades de las bacterias diazotróficas solubilizadoras de fosfato ofrecen perspectivas prometedoras, la ausencia de cepas nativas caracterizadas en cuanto a sus mecanismos de acción, limita la obtención de productos que puedan ser aplicados para la producción sostenible de cultivos de importancia económica dentro de los que se incluye *O. sativa*. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar bacterias diazotróficas nativas de *O. sativa* en Cuba en cuanto a su capacidad solubilizadora de fosfatos inorgánicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Origen, pureza y multiplicación de aislados bacterianos*

Se seleccionaron los aislados diazotróficos autóctonos cubanos *Pseudomonas* sp. SN2415 y SN4528; *Azospirillum* sp. RN2621, SN2414, RN4640, RN4641, RN1614, RN2623, RN1509, RN3530, RN2622, RN1406, RN2416, RN1506, RJ1245, SJ2438 y RN3531; *Herbaspirillum* sp. RN1510, RN2417, RN3631, RN3425, RN2531, SJ2647, SJ2438, SN3633, RJ2545, SN2519, RJ1442, RJ2647 y RN1519 (aislados de *O. sativa*) depositados en la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana (La Habana, Cuba). Además, se utilizó la cepa patrón *Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa PAL5T (BR 11281) (aislada de *Saccharum officinarum* L.) procedente de la Colección de Cultivos de EMBRAPA Agrobiología, Seropédica, Brasil.

Las bacterias se sembraron en medio de cultivo líquido DYGS (Rodríguez *et al.*, 1986) y luego se pasaron a medio de cultivo Luria Bertani (LB) sólido para la verificación de la pureza. De las placas de LB sólido se tomaron colonias aisladas y se resembraron en los medios de cultivo semisólidos NFb (Dobereiner *et al.*, 1976), JNFb (Baldani *et al.*, 1992) y JMV (Baldani *et al.*, 1996), según el género. Una vez verificada la pureza de los cultivos bacterianos, se mantuvieron en Medio Basal con Sacarosa (BMS) (Baldani *et al.*, 2014) sólido para la realización de los experimentos propuestos.

### Ensayos en medio sólido suplementado con diferentes fuentes de P

Se realizaron dos ensayos para seleccionar los aislados con potencial en la solubilización de fosfatos. En el primero los aislados se sembraron en medio LB sólido y se incubaron durante 24 horas a 30°C. Se prepararon suspensiones celulares de cada aislado según tubo 2 de la escala MacFarland (concentración  $6 \times 10^8$  células. mL<sup>-1</sup>) y se inocularon 10 µL en medio NBRIP (Nautiyal, 1999) sólido suplementado con tres fuentes de P (FePO<sub>4</sub>, AlPO<sub>4</sub> y Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>). Como criterio de selección se utilizó la visualización de halo de solubilización a los 5 días post- inoculación.

En el segundo ensayo se comprobó la eficiencia de la solubilización de los aislados seleccionados. Para ello se inocularon 10 µL de las suspensiones celulares en placas con medio NBRIP sólido suplementado con FePO<sub>4</sub> y AlPO<sub>4</sub>. Las placas se incubaron a 30°C y se midió el halo de solubilización a los 3, 5 y 7 días post-inoculación. Se calculó el Índice de eficiencia de la Solubilización (IS) de cada aislado de acuerdo a la metodología descrita por Kumar y Narula (1999). En ambos ensayos se utilizó como control positivo la cepa patrón *G. diazotrophicus* PAL5T y como control negativo una placa con agua destilada estéril. Se establecieron 5 réplicas por aislado y se realizaron tres repeticiones de los ensayos.

### Determinación de P soluble en medio líquido

Se seleccionaron los aislados con los mayores índices de solubilización en medio sólido suplementados con FePO<sub>4</sub> y AlPO<sub>4</sub>. Se cultivaron en medio DYGS sólido e incubaron durante 24 horas a 30°C. A continuación, se prepararon suspensiones celulares a una concentración de  $6 \times 10^8$  células. mL<sup>-1</sup>, según tubo 2 de la escala de MacFarland. Estas se utilizaron para inocular erlenmeyers de 100 mL que contenían 15 mL de medio NBRIP líquido suplementado con FePO<sub>4</sub> y AlPO<sub>4</sub>. Se incubaron en zaranda a 30°C y a 150 rpm. A los 3, 5 y 7 días post-inoculación se determinaron las concentraciones de P soluble mediante el micrométodo de Fosfomolibdeno Azul, según Chen *et al.* (2006). Los cambios en el pH del medio y la concentración celular se determinaron mediante la técnica de Microdrop (Spencer y Ragout, 2001).

Se utilizó como blanco el control negativo (medio + agua estéril) previamente centrifugado con los reactivos añadidos. Se elaboró una curva patrón a partir de concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0 mg/mL, 5 mg/mL,

15 mg/mL, 35 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL), a la cual se le determinó la ecuación  $y = 0,0079x + 0,0547$ . La concentración de P en las muestras se determinó sustituyendo los valores de absorbancia en la ecuación de la curva patrón.

### Bioensayo en plantas de *O. sativa* con los aislados seleccionados y diferentes fuentes de fósforo

Se pregerminaron semillas de *O. sativa* cultivar INCA LP-7, previamente desinfectadas y germinadas durante 15 días en cámaras húmedas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010). Posteriormente, se seleccionaron plantas de crecimiento uniforme (tamaño entre 7 y 8 cm) y se sembraron en macetas con 500g de suelo Hidromórfico Gley Nodular petroférico tipo Loam estéril, procedente de Los Palacios, Pinar del Río (Tabla 1).

**Tabla 1.** Valores de fertilidad química y pH del suelo de la localidad "Los Palacios", Pinar del Río.

**Tabla 1.** Values of chemical fertility and soil pH of "Los Palacios" Pinar del Río.

| Indicadores                       | Valores (mg*100g de suelo <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------|---|
| Materia orgánica                  | 3,91                                      |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>     | 12,34                                     |
| K <sup>2+</sup>                   | 12,31                                     |
| K <sup>+</sup>                    | 0,70                                      |
| Ca <sup>2+</sup>                  | 6,83                                      |
| Mg <sup>2+</sup>                  | 3,16                                      |
| Na <sup>+</sup>                   | 0,16                                      |
| pH (en H <sub>2</sub> O y en KCl) | 6,32                                      |

Se utilizaron FePO<sub>4</sub> y AlPO<sub>4</sub> como fuentes de P y los tratamientos se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Tratamientos (T) empleados en el experimento *in vivo*.

**Tabla 2.** Treatments (T) used in *in vivo* experiments.

| T  | Aislados | Fuente de fosfato   | Dosis    | NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> | K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|----|----------|---------------------|----------|---------------------------------|--------------------------------|
| T1 | -        | -                   | -        | 60 mg/kg                        | 100 mg/kg                      |
| T2 | -        | Fosfato de Hierro   | 80 mg/kg | 60 mg/kg                        | 100 mg/kg                      |
| T3 | -        | Fosfato de Aluminio | 80 mg/kg | 60 mg/kg                        | 100 mg/kg                      |
| T4 | RJ1442   | Fosfato de Hierro   | 80 mg/kg | 60 mg/kg                        | 100 mg/kg                      |
| T5 | RJ1442   | Fosfato de Aluminio | 80 mg/kg | 60 mg/kg                        | 100 mg/kg                      |
| T6 | SN4528   | Fosfato de Hierro   | 80 mg/kg | 60 mg/kg                        | 100 mg/kg                      |
| T7 | SN4528   | Fosfato de Aluminio | 80 mg/kg | 60 mg/kg                        | 100 mg/kg                      |

Cada maceta se inoculó con 1 mL de la suspensión bacteriana a una concentración de  $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> (tubo 0,5 de MacFarland). Los recipientes se suplementaron con 10 mL de una solución de micronutrientes compuesta por: MgNO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O(37.5g), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (3.94g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2.227g), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(0.075g), NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.125g), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (5g), ácido cítrico (5g) y agua destilada hasta completar 250 mL. Al cabo de 25 días, las plantas se removieron cuidadosamente de las macetas, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel de filtro y se procedió a separar la sección aérea de la raíz para determinar los parámetros de promoción del crecimiento vegetal: longitud de la raíz y longitud de la parte aérea (cm), masa fresca aérea y de la raíz (mg). El ensayo se mantuvo bajo condiciones semicontroladas de humedad y temperatura en casa de cristal. La iluminación se adaptó al fotoperíodo natural (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad). El experimento se realizó con un diseño en bloques al azar con cinco réplicas por tratamiento. Se realizaron tres repeticiones del experimento.

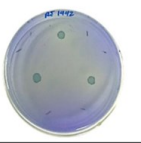
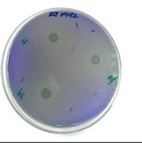
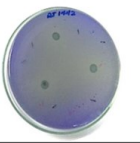
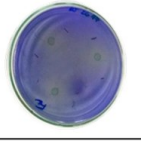
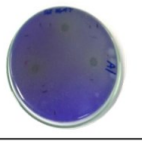
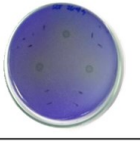
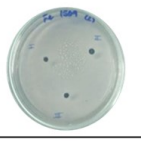
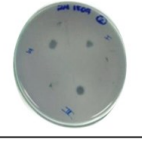
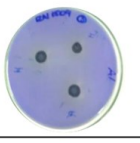


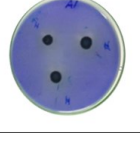
#### Análisis biométrico

A todos los parámetros, como punto de partida, se le realizó la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk

(Shapiro y Wilk, 1965) haciendo uso de la versión simplificada por Shapiro y Francia (1972), y la prueba de homogeneidad de varianza. A partir de dichas pruebas, se decidió realizar los análisis paramétricos o no paramétricos, según correspondiera. En los bioensayos que presentaron distribución normal, se realizó la prueba paramétrica de comparación múltiple de medias de Student-Newman-Keuls (SNK). Para la comparación de dos medias en medio líquido se utilizó la prueba t de Student. En los bioensayos que no presentaron distribución normal, los datos fueron analizados usando la prueba no paramétrica de comparación múltiple de medias de Kruskal Wallis completado con Mann-Whitney y la corrección de Bonferroni. Se utilizó el paquete estadístico Statistica Versión 8.0.

## RESULTADOS

El 100% (30) de los aislados seleccionados mostró potencial en la solubilización de diferentes fuentes de P. Esto se corresponde con la formación de un halo de solubilización alrededor de la colonia bacteriana en medio NBRIP suplementado con FePO<sub>4</sub>, AlPO<sub>4</sub> y Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. La figura 1 muestra la solubilización de P de las cepas RJ1442, RJ2647, RN1509, RN2628.

|                         | Aislados | Fuente de P   |  |   |
|-------------------------|----------|---|--|---|
|                         |          | FePO <sub>4</sub>   | AlPO <sub>4</sub>  | Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                                       |
| 5 días post-inoculación | RJ 1442  |  |  |  |
|                         | RJ 2647  |  |  |  |
| 7 días post-inoculación | RN 1509  |  |  |  |
|                         | RN 2622  |  |  |  |

**Figura 1.** Formación de halos alrededor de las colonias de los aislados RJ1442, RJ2647, RN1509, RN2622 en medio NBRIP suplementado con FePO<sub>4</sub>, AlPO<sub>4</sub> y Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> a los 5 y 7 días post-inoculación.

**Figure 1.** Halo formation around de colonies of isolates RJ1442, RJ2647, RN1509, RN2622 in NBRIP media supplemented with FePO<sub>4</sub>, AlPO<sub>4</sub> and Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 and 7 days post inoculation.

Los aislados seleccionados para este estudio mostraron capacidad solubilizadora de fósforo en medio NBRIP sólido suplementado con  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$ . En el medio suplementado con  $\text{FePO}_4$ , los mayores IS se obtuvieron en el día 7 de crecimiento bacteriano, en un rango de valores entre 2,12 y 11,99 (Tabla 3). Se destaca por la mayor solubilización de esta fuente de P el aislado RJ1442 (IS 11,99), seguido por RN1509, RN2622, RJ2545 y SN4528 (IS 11,98 - 10,64).

Con relación al medio suplementado con  $\text{AlPO}_4$ , los IS estuvieron entre 2,52 y 9,70. Los aislados RJ2647, RJ1442, SJ2438, RN4640 y SN4528 mostraron la mayor capacidad solubilizadora de  $\text{AlPO}_4$ , con IS de 9,78; 9,70; 9,68; 9,65 y 9,56; respectivamente.

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron los aislados RN1509, RN2622, RN2545, RN4640, SN4828, RJ1442, RJ2647 y SJ2438 para el ensayo con medio líquido.

**Tabla 3.** Índices de solubilización de P de las cepas evaluadas en medio NBRIP suplementado con  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$ .

**Table 3.** P solubilization index of the strains evaluated in NBRIP media supplemented with  $\text{FePO}_4$  and  $\text{AlPO}_4$

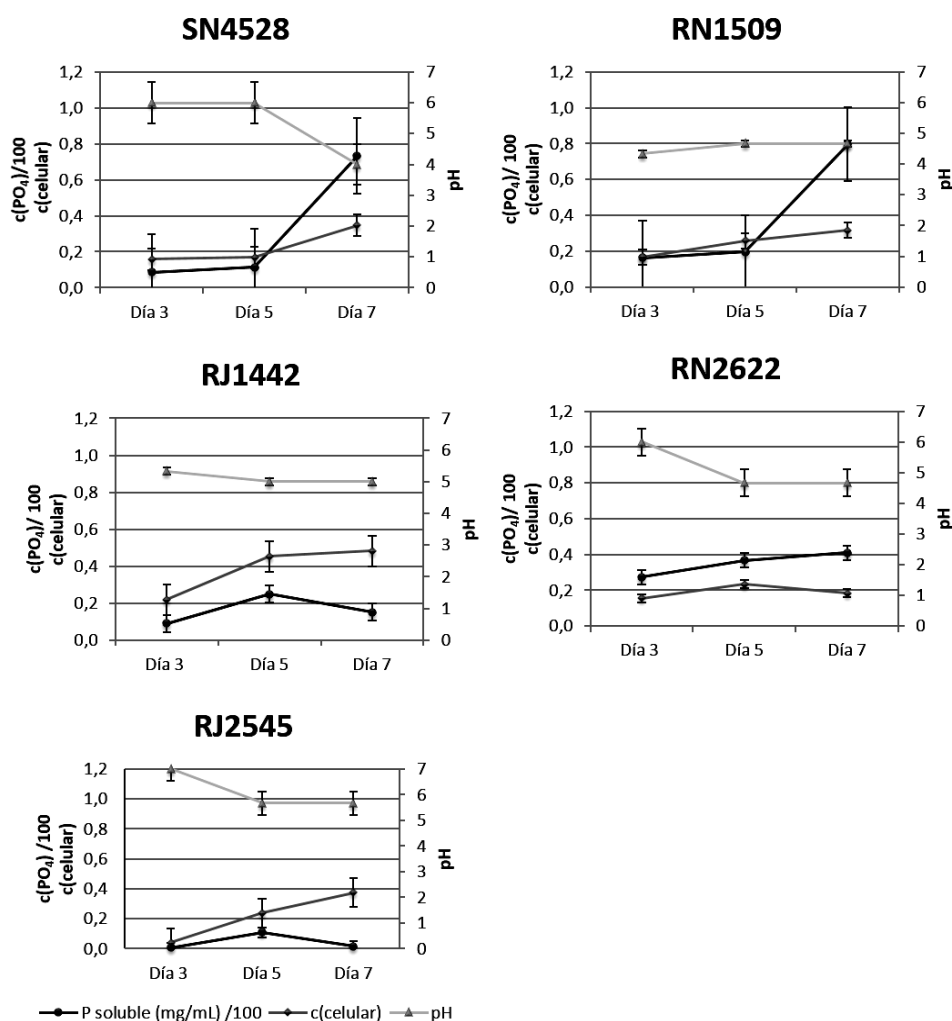
| Aislado | Fosfato de hierro ( $\text{FePO}_4$ ) |        |           | Fosfato de Aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) |       |          |
|---------|---------------------------------------|--------|-----------|---|-------|----------|
|         | Día 3                                 | Día 5  | Día 7     | Día 3                                   | Día 5 | Día 7    |
| PAL5T   | 1,835                                 | 2,450  | 2,898 b   | 1,630                                   | 3,666 | 5,583 b  |
| RN1509  | 2,521                                 | 6,683  | 11,983 ab | 2,310                                   | 5,480 | 8,810 ab |
| RN2622  | 2,116                                 | 4,416  | 10,993 ab | 2,078                                   | 5,223 | 9,585 ab |
| RN1508  | 1,850                                 | 3,916  | 6,993 ab  | 1,467                                   | 2,942 | 4,707 b  |
| RN2416  | 1,695                                 | 2,605  | 4,735 b   | 1,774                                   | 1,685 | 4,970 b  |
| RN2417  | 1,788                                 | 2,48   | 4,376 b   | 1,612                                   | 1,576 | 3,650 b  |
| RN1614  | 1,995                                 | 3,126  | 5,048 b   | 1,604                                   | 1,712 | 4,336 b  |
| RN2623  | 1,825                                 | 3,785  | 3,753 b   | 1,711                                   | 3,063 | 4,206 b  |
| RN1406  | 1,858                                 | 3,466  | 5,555 b   | 1,704                                   | 3,436 | 5,317 b  |
| RN2621  | 1,725                                 | 3,416  | 3,715 b   | 1,623                                   | 2,953 | 4,256 b  |
| RN2620  | 2,490                                 | 2,716  | 3,050 b   | 2,468                                   | 2,483 | 2,520 b  |
| RN4640  | 3,865                                 | 6,680  | 6,841 ab  | 4,326                                   | 6,474 | 9,655 a  |
| RN4641  | 5,278                                 | 7,046  | 6,900 ab  | 5,026                                   | 6,550 | 8,428 ab |
| RN4650  | 1,223                                 | 1,775  | 2,122 b   | 3,368                                   | 4,534 | 4,791b   |
| RJ1442  | 7,94                                  | 10,665 | 11,996 a  | 6,990                                   | 8,541 | 9,708 a  |
| RJ2647  | 5,575                                 | 8,365  | 8,7 ab    | 6,016                                   | 7,986 | 9,781 a  |
| RN3531  | 6,268                                 | 7,455  | 8,436 ab  | 5,372                                   | 7,361 | 7,730 ab |
| RN3530  | 6,743                                 | 9,068  | 9,586 ab  | 4,900                                   | 8,621 | 8,995 ab |
| RN4539  | 7,220                                 | 9,313  | 10,266 ab | 4,140                                   | 5,877 | 6,224 ab |
| RJ2545  | 6,266                                 | 10,045 | 10,83 ab  | 4,880                                   | 6,096 | 6,766 ab |
| SN3422  | 3,310                                 | 4,778  | 6,205 ab  | 5,452                                   | 6,303 | 7,287 ab |
| SN4528  | 6,910                                 | 10,065 | 10,643 ab | 7,576                                   | 8,531 | 9,561 a  |
| SN2416  | 1,876                                 | 2,886  | 4,833 b   | 3,452                                   | 4,014 | 5,232 b  |
| SN2414  | 5,005                                 | 6,125  | 7,161 ab  | 2,866                                   | 3,482 | 4,306 b  |
| SN1408  | 2,16                                  | 2,316  | 2,441 b   | 2,205                                   | 4,907 | 6,018 ab |
| SN1410  | 2,203                                 | 2,588  | 3,100 b   | 2,111                                   | 5,017 | 7,583 ab |
| SJ1432  | 6,436                                 | 7,998  | 9,101 ab  | 6,863                                   | 9,273 | 9,555 ab |
| SJ1433  | 6,450                                 | 8,015  | 8,185 ab  | 5,286                                   | 9,066 | 8,092 ab |
| SJ2438  | 7,013                                 | 9,21   | 9,545 ab  | 5,973                                   | 8,420 | 9,684 a  |
| SJ2437  | 6,246                                 | 9,440  | 9,376 ab  | 4,597                                   | 9,516 | 8,945 ab |
| SN2415  | 5,341                                 | 6,068  | 6,566 ab  | 4,886                                   | 5,505 | 6,226 ab |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores según la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias para  $p=0,05$

### Determinación de P soluble en medio líquido

En medio NBRIP suplementado con  $\text{FePO}_4$  se obtuvieron concentraciones del ion P en el sobrenadante del cultivo de entre 33,27 mg/L y 2,43 mg/L. El aislado RN2622 fue el mejor solubilizador, con un máximo de P soluble de 33,27 mg/L alcanzado en el 7<sup>mo</sup> día de incubación, en el que también alcanzó la máxima concentración celular a un pH de 4,6 (Fig. 2). Los aislados RN1509, RJ2545, RJ1442 y SN4528 mostraron los máximos valores de P soluble a los 5 días.

La mayoría tuvieron la mayor concentración celular en el 7<sup>mo</sup> día con excepción de RN1509 que la alcanzó el 5<sup>to</sup> día de crecimiento. Estos aislados presentan un comportamiento similar después del 5<sup>to</sup> día. En este sentido, se aprecia una disminución de las concentraciones de P soluble libre en el medio acompañado de un aumento de la concentración celular, parámetro que alcanza su máximo valor en el día 7. En cuanto al pH del medio, los aislados RJ1442, RJ2545 y RN2622 alcanzaron su valor mínimo el día 5, mientras que los aislados RN1509 y SN4528 lo alcanzaron el 7<sup>mo</sup> día.



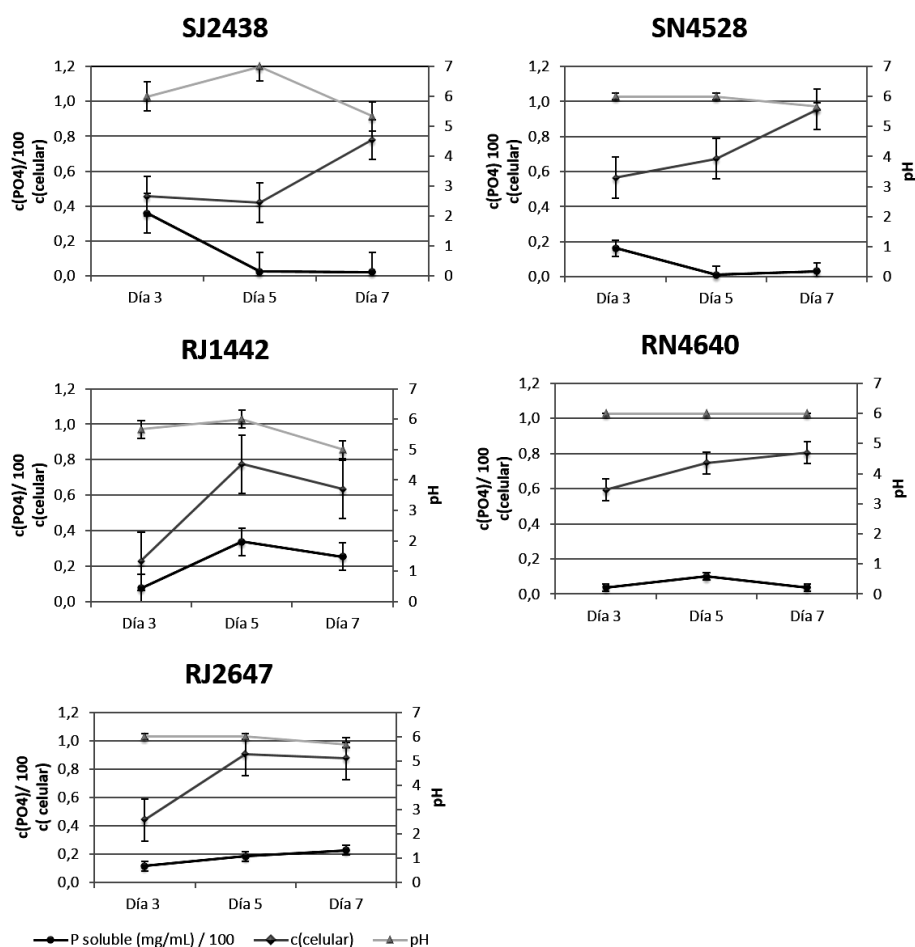
**Figura 2.** Capacidad solubilizadora de  $\text{FePO}_4$  en medio NBRIP líquido, cambios en el pH y concentración celular de los aislados SN4528, RN1509, RN2622, RJ1442 y RJ2545 en condiciones experimentales de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 7 días, agitación 130 rpm. Barras de error representan desviación estándar de tres repeticiones.

**Figure 2.**  $\text{FePO}_4$  solubilizing capacity in NBRIP liquid media, changes in pH and cell concentration of isolates SN4528, RN1509, RN2622, RJ1442 y RJ2545 under experimental conditions of  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 7 days, 130 rpm agitation. Error bars represent standard deviation of three repetitions.

Cuando el medio de cultivo fue suplementado con  $AlPO_4$  las concentraciones del ion P en el sobrenadante variaron entre 29,87 mg/L y 1,05 mg/L. El aislado RJ1442 alcanzó la mayor concentración de P soluble registrada entre todos los aislados probados en el experimento, con un valor en el 5to día de incubación de 29,87 mg/L, en el que también alcanzó su máxima concentración celular a un pH de 5,33 (Fig.3). A partir de este día y hasta el día 7, el pH descendió a 5 y se detectó una disminución en la concentración celular conjuntamente con los niveles de P en el medio. Un comportamiento similar fue encontrado en el aislado RN4640 que alcanzó su máximo valor de P soluble en el día 5 a un pH de 5,33. A partir de este día se observó una disminución en las concentraciones de P soluble en

el medio, acompañada de un aumento en la concentración celular que alcanzó su máximo en el día 7, mientras que el pH se mantuvo constante. Por otra parte, el aislado RJ2647 mostró sus mejores resultados de solubilización el 7mo día a un pH de 5,33, aunque la máxima concentración celular se alcanzó el día 5 de crecimiento.

El aislado SN4528 presentó los máximos niveles de P soluble el día 3 post-inoculación a un pH=6. Posteriormente se observó una disminución abrupta de los niveles de P soluble en el medio hasta el día 5, con un aumento considerable de la concentración celular. Este comportamiento se extendió hasta el 7mo día, donde este parámetro alcanzó su máximo y el pH disminuyó a 5. El pH del control (pH = 7) se mantuvo constante durante los 7 días.



**Figura 3.** Capacidad solubilizadora de  $AlPO_4$  en medio NBRIP líquido, cambios en el pH y concentración celular de los aislados SJ2438, SJ4528, RN4640, RJ1442 y RJ2647 en condiciones experimentales de  $30 \pm 2^\circ C$ , 7 días, agitación 130 rpm. Barras de error representan desviación estándar de tres repeticiones.

**Figure 3.**  $AlPO_4$  solubilizing capacity in NBRIP liquid media, changes in pH and cell concentration of isolates SJ2438, SJ4528, RN4640, RJ1442 and RJ2647 under experimental conditions of  $30 \pm 2^\circ C$ , 7 days, 130 rpm agitation. Error bars represent standard deviation of three repetitions.

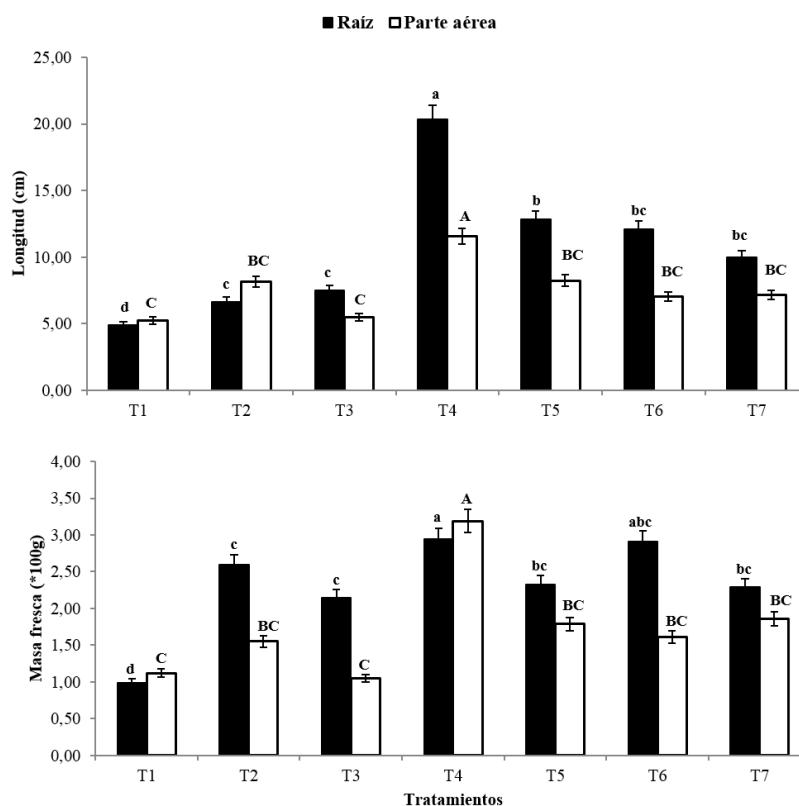
La figura 4 muestra el efecto de los tratamientos sobre los parámetros de promoción del crecimiento evaluados. En los tratamientos donde se inoculan los aislados seleccionados y se incluye una fuente de fosfato insoluble, se muestran diferencias significativas en cuanto a la masa fresca de la raíz con respecto al tratamiento control sin fuente de P y sin bacteria (T1). El tratamiento donde se aplicó el aislado RJ1442 y  $\text{FePO}_4$  (T4), alcanzó los mayores valores de longitud de la raíz (20,36 cm), longitud de la parte aérea (11,44 cm), masa fresca de la raíz (31,78 mg) y masa fresca de la parte aérea (34,47 mg) (Figuras 4 y 5), con diferencias significativas en relación a los demás tratamientos. El tratamiento 5 alcanzó la segunda mayor longitud de la raíz (12,81 cm) y aunque no se diferenció del resto de los tratamientos inoculados con bacterias (T6, T7), mostró tendencias superiores a los controles (T1, T2 y T3) para este parámetro.

La figura 5 muestra la estimulación del crecimiento vegetal cuando se aplican el aislado RJ1442 y  $\text{FePO}_4$  (T4) con relación a los tratamientos control (T1 y T2).

## DISCUSIÓN

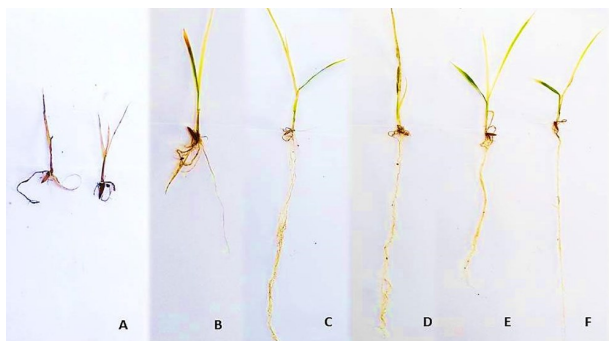
### Capacidad solubilizadora de P en los aislados seleccionados

El P es un macronutriente esencial determinante para la productividad agrícola (Stutter *et al.*, 2015). Este elemento se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza en sus formas orgánica e inorgánica (Corrales *et al.*, 2014). Sin embargo, solo puede ser absorbido como ortofosfato soluble cuya disponibilidad en el suelo es limitada (Taktek *et al.*, 2014). La fertilización química con P soluble es un método costoso y poco efectivo ya que el anión  $\text{PO}_4^{3-}$  se fija rápidamente a cationes metálicos en el suelo, principalmente  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Gupta *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Parámetros de promoción del crecimiento vegetal evaluados en el bioensayo utilizando  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$  como fuente de fosfato insoluble. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Neuman-Keuls para los parámetros referentes a la raíz y parte aérea respectivamente.

**Figure 4.** Plant growth promotion parameters evaluated in the bioassay using  $\text{FePO}_4$  and  $\text{AlPO}_4$  insoluble phosphate sources. Different upper and lower case letters indicate significant differences between treatments according to Neuman-Keuls test for the parameters referring to the root and aerial part respectively.



**Figura 5.** Plantas de arroz cultivar INCA-LP7 de 30 días de crecimiento. A) T1: Control sin fuente de P y sin inocular; B) T2: Control con  $\text{FePO}_4$  sin inocular; C, D, E, F) T4: RJ1442 con  $\text{FePO}_4$ .

**Figure 5.** INCA-LP7 rice plants 30 days of growth. A) T1: Control without P source and without inoculating; B) T2: Control with  $\text{FePO}_4$  without inoculating; C, D, E, F) T4: RJ1442 with  $\text{FePO}_4$ .

Para aumentar la tasa de absorción de este nutriente la planta cuenta con diversos mecanismos (Kelel *et al.*, 2014). Entre estos mecanismos se destaca el establecimiento de relaciones interespecíficas con microorganismos solubilizadores de P presentes en la rizosfera (Satyaprakash *et al.*, 2017).

En este estudio se seleccionaron aislados diazotróficos nativos de un agroecosistema arrocero cubano y se determinó su capacidad solubilizadora de fosfatos en condiciones *in vitro*. Se demostró que el 100% de los aislados evaluados tiene potencial para la solubilización de fosfatos, sin embargo solo el 16% (5) evidenció eficiencia en la solubilización. Estos resultados se corresponden con los publicados por Estrada *et al.* (2013) que obtuvieron un 10% de bacterias diazotróficas solubilizadoras de fosfato sobre medio NBRIP, aisladas a partir de plantas de *O. sativa*. Así mismo Rangjaroen *et al.* (2015) caracterizaron 23 aislados diazotróficos provenientes de la raíz de plantas de *O. sativa* y demostraron que el 80% de estos tenía capacidad solubilizadora de P, aunque no informaron su eficiencia.

Con el fin de comprobar el potencial solubilizador de los aislados a través de la bioprospección, la mayoría de los estudios emplean medio sólido suplementado con una fuente de P insoluble, generalmente fosfato tricálcico. Sin embargo, Bashan *et al.* (2013), afirmaron que no debe usarse esta fuente fosfatada como factor universal para el aislamiento y evaluación de BSF, y recomiendan como método más acertado la combinación de dos o tres compuestos metal-P.

Los resultados de este estudio evidencian que existen discordancias en los índices de solubilización obtenidos en fosfato tricálcico, respecto a los obtenidos en otras fuentes de P. Esto podría estar relacionado con lo planteado por Restrepo-Franco *et al.* (2015) quienes recomendaron utilizar medio NBRIP suplementado con diferentes fuentes de P, en correspondencia con el tipo de suelo donde se pretendan aplicar estos aislados como inoculante microbiano.

Sobre la base de estos criterios se seleccionaron las fuentes de fosfato insoluble  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$  para la caracterización de aislados solubilizadores de fosfato a aplicar en beneficio del cultivo de *O. sativa*. Se tuvo en cuenta además que “Los Palacios”, Pinar del Río, constituye uno de los principales macizos arroceros en Cuba y que el suelo en esta localidad es del tipo Hidromórfico Gley Nodular Petroférrico (Hernández y Ascanio, 2006). Este suelo se caracteriza por tener un pH cercano a la neutralidad y un alto contenido de materia orgánica (Hernández y Nápoles, 2017). Este suelo tiende a tornarse ácido en diferentes estadios fenológicos del cultivo del arroz debido a las condiciones de inundación, alcanzando valores de pH entre 3 y 4 (Ruíz, 2006). En suelos ácidos los iones  $\text{PO}_4^{3-}$  precipitan rápidamente con  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Al}^{+3}$  (García *et al.*, 2015), lo que confirma la importancia de seleccionar bacterias que solubilicen estas dos fuentes de P.

#### *Cuantificación de P soluble en el sobrenadante del cultivo de aislados seleccionados*

A partir de las recomendaciones realizadas por Bashan *et al.* (2013), numerosos autores complementan los resultados de medio sólido con ensayos en medio líquido para corroborar la capacidad de las bacterias en cuanto a la solubilización de diferentes fuentes de P (Estrada *et al.*, 2013; Tejera-Hernández *et al.*, 2013; Chauhan *et al.*, 2016; Baliah *et al.*, 2016; Anzuay *et al.*, 2017; Selvi *et al.*, 2017).

En esta investigación los aislados RN1509, RJ1442, RJ2545, SJ2438 y RN4640 presentaron los mayores niveles de P soluble a los 5 días. Este resultado se corresponde con lo informado por diversos autores, que plantean niveles máximos de solubilización de las bacterias el 5<sup>to</sup> día de crecimiento (Estrada *et al.*, 2013; Paul y Sinha, 2017). Los aislados RN2622 y RJ2647 mostraron los mayores niveles de solubilización en el 7<sup>mo</sup> día. El aislado SN4528 mostró su máximo de solubilización en  $\text{FePO}_4$  el 5to día y en  $\text{AlPO}_4$  el 3er día, lo que podría estar relacionado con su velocidad de crecimiento y su

nivel de solubilización (Restrepo-Franco *et al.*, 2015). En la mayoría de los aislados se observó una disminución en las concentraciones de P soluble en el medio posterior al día de máxima solubilización, acompañado de un aumento en la concentración celular. Este comportamiento podría estar relacionado con la internalización de P en la célula.

La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular es uno de los mecanismos de solubilización más importantes que presentan las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), ya que estos quelatan los cationes metálicos unidos al fosfato (Oteíno *et al.*, 2014). La liberación de estos ácidos durante los experimentos en medios líquidos resulta en la acidificación, por lo que el pH del medio es también un parámetro indicador de la actividad solubilizadora de las bacterias. En estudios realizados por López-Ortega *et al.* (2013), Abreu *et al.* (2017) y Selvi *et al.* (2017) se informó la existencia de una correlación inversa entre el pH y el P soluble. En la presente investigación los valores mínimos de pH de la mayoría de los aislados se mostraron entre los días 5 y 7 de crecimiento, en los que también se alcanzó la máxima concentración de P soluble.

Los niveles de P soluble alcanzados en NBRIP líquido suplementado con  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$  están en el orden de los obtenidos por Anzuay *et al.* (2017), que evaluaron cepas de los géneros *Serratia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* en iguales condiciones. Estos resultados también son similares a los informados por Selvi *et al.* (2017) que obtuvieron niveles de P soluble entre 11,85 mg/L y 61,96 mg/L en medio NBRIP con fosfato tricálcico.

Actualmente no se utiliza un método estándar para la realización de este ensayo, por lo que las condiciones experimentales y las formas en que se colectan los resultados varían entre autores (López-Ortega *et al.*, 2013; Paul y Sinha, 2017; Pradhan *et al.*, 2016; Anzuay *et al.*, 2017; Selvi *et al.*, 2017). Según lo planteado por Abreu *et al.* (2017), la eficiencia solubilizadora de fosfatos depende del medio de cultivo y de la fuente de P empleada para evaluación, elementos que también difieren en los estudios revisados. A partir de estos criterios se puede esperar que existan diferencias entre los resultados mostrados por la mayoría de los autores en la cuantificación de P soluble. Sin embargo, la comparación entre los resultados del experimento en medio líquido y los valores informados por otros estudios permitieron establecer una relación entre la eficiencia de los aislados caracterizados y cepas referentes en la solubilización de fosfatos (Restrepo-Franco *et al.*, 2015).

#### *Promoción del crecimiento vegetal en el bioensayo en plantas de O. sativa*

En este estudio se demostró que los tratamientos que incluyen la inoculación con las cepas bacterianas tuvieron efecto potenciador del crecimiento de la parte aérea y de la raíz de plantas de *O. sativa*. El aislado RJ1442 mostró la mayor actividad promotora del crecimiento vegetal en suelos suplementados con ambas fuentes de P con una mayor eficiencia en la solubilización en  $\text{FePO}_4$ .

Estos resultados coinciden con la investigación realizada por Pradhan *et al.* (2016) que al inocular cepas del género *Burkholderia* en NBRIP líquido obtuvieron mayores niveles de P soluble en el medio suplementado con  $\text{FePO}_4$  que en el que contenía  $\text{AlPO}_4$ . Estos autores plantean que este comportamiento está relacionado con la fuente de aislamiento.

El hábitat es un factor determinante en la regulación génica en bacterias, de manera que el fenotipo expresado responde a las necesidades de supervivencia y adaptación a ese ambiente (Madigan *et al.*, 2017). Debido a esto, autores como de Bolle *et al.* (2012), Bashan *et al.* (2013) y Restrepo-Franco *et al.* (2015) plantean que para evaluar las potencialidades de bacterias en cuanto a la solubilización de fosfatos se deben reproducir las condiciones de procedencia. Estas condiciones pueden ser: fuente de fosfato insoluble, temperatura, humedad, pH del medio y densidad. Las diferencias observadas en los niveles de solubilización de  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$  en las cepas evaluadas pueden deberse a las características edáficas del lugar de muestreo. En el suelo de Los Palacios, Pinar del Río el  $\text{FePO}_4$  es la forma de P insoluble más abundante (Hernández y Nápoles, 2017).

Además de la solubilización de fosfatos, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal cuentan con otros mecanismos potenciadores del crecimiento de las plantas. Los géneros *Herbaspirillum* y *Pseudomonas*, a los que pertenecen los aislados RJ1442 y SN4528, respectivamente, son de gran interés agrícola por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, producir fitohormonas y reguladores del crecimiento vegetal, entre otras potencialidades (Acebo *et al.*, 2011; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013). Se debe destacar que los aislados evaluados como inoculante, además de aportar fósforo a la planta mediante la solubilización de fosfatos, aportan nitrógeno a través de la fijación y producen fitohormonas tipo AIA, lo que puede haber influido en las diferencias observadas entre el control sin inocular y los demás tratamientos.

Diversos autores han evaluado el efecto de la inoculación de plantas con BSF aisladas del propio ecosistema (Anzuay *et al.*, 2017; Restrepo-Franco *et al.*, 2015). Los aislados *Pseudomonas* SN4528 y *Herbaspirillum* RJ1442 tienen la capacidad de solubilizar  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$  y son eficientes en la estimulación del crecimiento vegetal favoreciendo la toma de agua y nutrientes por la planta. Esto denota su potencial para ser utilizadas como inoculantes microbianos en beneficio de *O. sativa* en suelos del occidente de Cuba, una vez que se demuestren sus potencialidades a escala de campo.

#### LITERATURA CITADA

- Abreu, C. S., J. E. Figueiredo, C. A. Oliveira, V. L. Dos Santos, *et al.* (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Gen. Mol. Res.* 16 (1), 120-126.
- Alam, M. y J. Ladha (2004). Optimizing phosphorus fertilization in an intensive vegetable-rice cropping system. *Biol. Fertility of Soils.* 40, 277-283. <https://doi.org/10.1007/s00347-004-0778-7>.
- Anzuay, M.S, M.G. Ruiz Ciancio, L.M. Ludueña, G. Angelini, *et al.* (2017). Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) Plants by single and mixed cultures of efficient phosphate Solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiol. Research* 199, 98–109.
- 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. Kirchof y E. Falsen (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.I., V. Massena Reis, S. Sampaio Videira, 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. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>.
- Baliah, N. T., G. Pandiarajan y B. M. Kumar (2016). Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Tropical Ecology*, 57(3), 465-474.
- Bashan, Y., A. A. Kamnev y L.E. de-Bashan (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol. Fertil. Soils*, 49, 465-479.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. and Biotech.*, 84(1),11-18.
- Chauhan, A., S. Guleria, P. Balgir, A. Walia, *et al.* (2016). Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Braz. J. Microbiol.*, 48: 94–304.
- Chen, Y., P. Rekha, A. Arun, F. Shen, *et al.* (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil. Ecol.* 34, 33-41.
- Corrales, L.C., Z.Y. Arévalo y V.E. Moreno (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA*, 12( 21), 15-21.
- Dash, N., A. Pahari y T.K. Dangar (2017). Functionalities of phosphate-solubilizing bacteria of bice rhizosphere. *Techniques and Perspectives. Recent. Adv. App. Microbiol.*,151-163. Springer Nature Singapore Pte Ltd. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5275-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5275-0_7)
- de Bolle S., N.T. Gebremikael, V. Maervoet, S. De Neve (2012). Performance of phosphate-solubilizing bacteria in soil under high phosphorus conditions. *Biol. Fertil. Soils.* 49, 705-714. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0759-1>.
- Estrada, G. A., V. L. D. Baldani, D. M. de Oliveira, S. Urquiaga y J.I. Baldani (2013). Selection of phosphate- solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*, 361. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>.
- FAO (2015). (Food and Agriculture Organization of the United Nations) FAO production yearbook. FAO production yearbook. Roma, Italia. Disponible en: <http://www.fao.org.2018.05.001>. Último acceso: 11 de junio de 2020.
- García, R.A., N.C. Lovaisa, E.L. Ulla (2015). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria in northwestern Argentina and its effect in promoting growth in maize (*Zea mays* L.) *Rev. Agron. Noroeste Arg.* 35 (1), 13-28.
- Gupta, D. K., S. Chatterjee, S. Datta, V. Veer, *et al.* (2014). Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere.* 108, 134-144.
- Hernández, I. y M.C. Nápoles (2017). Rizobios residentes en la rizosfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5. *Cult. Trop.* 38 (1), 39-49.
- Hernández, A. J., y J. M. Ascanio (2006). La historia de la clasificación de los suelos en Cuba. La Habana: Editorial Félix Varela. 64 pp. .
- Hernández-Rodríguez A, D. León-Plasencia D, N. Rives- Rodríguez N, A. Díaz de la Osa, *et al.* (2010). Identification of native isolates of fluorescent pseudomonas with antagonistic activity against *Curvularia* spp. *Rev. Protec. Veg.* 26(2), 21-29.
- Hernández-Rodríguez, A., Y. Acebo-Guerrero, G. Pijera, G., A. de la Osa, *et al.* (2018) Characterization of fluorescent *Pseudomonas* from *Oryza sativa* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Pyricularia oryzae* (Sacc.). *African J. Biotech.* 17(38) 1196-1206. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16478>.

- Kalayu, G. (2019). Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *Int. J. Agron.* 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.
- Kelel, M., G. Abera, A. Yisma, B. Molla, *et al.* (2014). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from acacia tree rhizosphere soil. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 4(5), 9-13.
- Kumar, V. y N. Narula (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol Fertil Soils*, 28, 301-305.
- López-Ortega, M.P., P.J. Criollo-Campos, R.M. Gómez-Vargas, M. Camelo-Rusinque, *et al.* (2013). Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 15, 115-123.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl y D. Clark (2017) *Brock Biology of Microorganisms*. (15th) Pearson Education. San Francisco, USA, 900pp.
- MINAGRI. (2019). Las estadísticas y la producción de alimentos en Cuba. Disponible en: [www.minag.gob.cu](http://www.minag.gob.cu). Último acceso: 11 de junio de 2020.
- Nautiyal C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265-70.
- Oteíno, N., R.D. Lally, S. Kiwanuka, A. Lloyd, *et al.* (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* 6, 745.
- Paul, D. y S.N. Sinha (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Ann. Agr. Sci.* 15(1),130-136.
- Pedraza, R., K. F. S. Teixeira, A. García de Salamone, I. Baca, *et al.* (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Rev. Corpoica-Cien. Tec. Agrop.*, 11(2), 155-164.
- Pradhan, M., S. Mohanty y R. Das (2016). Isolation of native phosphorus solubilizing bacteria from alfisols of Odisha. *Int. J. Adv. Chem. Science Appl.*, 4, 56-61.
- Rangjaroen, C., B. Rerkasem, N. Teamroong, R. Noisangiam, *et al.* (2015) Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. *Annals Microbiol.* 65(1), 253-266. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0857-4>.
- Restrepo-Franco, G., S. Marulanda-Moreno, Y. de la Fe-Pérez, A. (2015) Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Cien. Biol.*, 46(1), 63-76.
- Rodríguez, J., V.A. Malavolta., O. Víctor (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. *Summa Phytop.* 12(1-2), 16.
- Roy, M. y Srivastava, R. (2013). Assembling BNF system in rice plant: frontier areas of research. *Curr. Sci. India.* 104(3), 326-334.
- Ruiz, M (2006). Efecto de diferentes tecnologías de producción en algunas propiedades físicas y químicas del suelo dedicado al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Ciencias del Suelo, Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez".
- Satyaprakash, M., T. Nikitha, E.U.B Reddi, B. Sadhana, *et al* (2017). Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sciences*, 6(4),2133-2144.
- Selvi, K.B., J.J.A. Paul, V. Vijaya y K. Saraswathi (2017). Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Bioch. Mol. Biol.* 3(1), 1-8.
- Shapiro, S. S. y M. B. Wilk (1965). An analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Shapiro, S. S. y R. S. Francia (1972). An approximate Analysis of Variance Test for Normality. *J American Statis. Ass.* 67: 215-216.
- Spencer J.F.T., A.L Ragout (2001). *Food microbiology protocols*, 1st edn. Humana Press, Totowa.
- Stutter, M. I., C. A. Shand, T. George, M.S. Blackwell, *et al.* (2015). Land use and soil factors affecting accumulation of phosphorus species in temperate soils. *Geoderma*, 257, 29-39.
- Taktek, S., M. Trépanier, P. Magallon Servin, M. St-Arnaud, *et al.* (2014). Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM, 197-198.
- Tejera-Hernández, B., M. Heydrich-Pérez y M. Rojas-Badía (2013) Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agron. Mesoam.* 24 (2), 357-364.
- Yanni, Y. G. y F. B. Dazzo (2010). Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. *Plant Soil*, 336:129-142. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0454-7>.
- Walia, A., S. Guleria, A. Chauhan y P. Mehta, (2017) Endophytic Bacteria: Role in Phosphate Solubilization. In D. K. Maheshwari y K. Annapurna (Eds.), *Endophytes: Crop Productivity and Protection: Volume 2* (pp. 61-93). Cham: Springer International Publishing. 306pp.
- Zou, K., D. Binkley y K.G Doxtadar (1992). New methods for estimating gross P mineralization rates in soils. *Plant Soil*, 147, 243-250.

