

Artículo original

Aislamiento y caracterización de *Stenotrophomonas* asociada a rizosfera de maíz (*Zea Mays* L.)

Reneé Pérez-Pérez^{1*}

Maxime Oudot²

Ionel Hernández¹

Maria C. Nápoles¹

Simón Pérez-Martínez³

Daynet Sosa-Del Castillo⁴

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

²Departamento de Ingeniería Biológica. Instituto Universitario de Tecnología, Lyon, Francia

³Universidad Estatal de Milagro (UNEMI), Facultad de Ciencias e Ingeniería. Vía Milagro km 26. Milagro, Ecuador

⁴Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador

* Autor para correspondencia: riny@inca.edu.cu

RESUMEN

La inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de interés agrícola como el maíz, constituye una alternativa económica y ambientalmente amigable a la fertilización química. *Stenotrophomonas* es un género bacteriano común en muchos tipos de suelos y rizosferas de diferentes cultivos y presenta mecanismos de promoción del crecimiento como la fijación biológica del nitrógeno, solubilización de minerales y producción de fitohormonas. En consecuencia, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar e identificar molecularmente cepas de *Stenotrophomonas* provenientes de la rizosfera de maíz. Para ello se realizó un aislamiento a partir de suelo rizosférico y rizoplano y se seleccionaron colonias con características culturales semejantes a las descritas para este

género. También se tuvieron en cuenta las características microscópicas y la capacidad para realizar la fijación biológica de nitrógeno, solubilizar diferentes fuentes de fosfato y potasio y la actividad antagonica frente a *Fusarium oxysporum*. La identificación molecular se realizó por secuenciación del ADNr 16S. Se obtuvieron un total de 20 aislados con características culturales, morfológicas y fisiológicas coincidentes con el género en cuestión. De estos 15 solubilizaron al menos una de las fuentes de fosfato utilizadas, dos solubilizaron las fuentes de potasio y seis mostraron antagonismo frente al patógeno. Siete aislados fueron identificados como *Stenotrophomonas* y el resto se incluyó en tres géneros, pertenecientes también al filo Proteobacteria. El aislado más integral en cuanto a los atributos positivos evaluados, fue INCA-FRr1 identificado como *Stenotrophomonas*. Este podría constituir un inoculante promisorio para el maíz y otros cultivos.

Palabras clave: PGPR, FBN, solubilización, antagonismo, biofertilización

Recibido: 14/10/2019

Aceptado: 05/04/2020

INTRODUCCIÓN

El maíz es un componente importante en la alimentación humana y animal. Es cultivado en las más diversas condiciones edáficas y ecológicas dada su alta plasticidad y su producción y consumo a nivel mundial, alcanzan las más elevadas cifras en comparación con otros cultivos ⁽¹⁾. Sin embargo, la disponibilidad de ciertos nutrientes, propiciada generalmente por la fertilización mineral, fundamentalmente nitrógeno, potasio y fósforo, es esencial para obtener rendimientos aceptables. Si bien la aplicación de estos insumos permite obtener rendimientos representativos, también constituyen un alto costo para el proceso productivo e impacta de forma negativa sobre el agroecosistema ⁽²⁾.

La utilización de biofertilizantes a base de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) resulta una alternativa viable para disminuir la carga de fertilizante mineral que se aplica cada año en la agricultura. Estos biopreparados resultan inocuos al ambiente, aumentan los rendimientos de los cultivos y disminuyen los costos de producción ⁽³⁾.

El género *Stenotrophomonas* se ha descrito como microbiota rizosférica de diferentes cultivos, incluido el maíz⁽⁴⁻⁷⁾ y se considera una PGPR por los diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que presenta. Estos incluyen la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN), solubilización de sales de fosfato, producción de índoles⁽⁶⁾ y síntesis de ACC desaminasa⁽⁸⁾.

En Cuba no existen estudios relacionados con la interacción *Stenotrophomonas*-maíz, ni con el uso del género para la explotación agrícola, por lo que el presente trabajo se propone aislar, identificar y caracterizar *Stenotrophomonas* de la rizosfera de maíz, así como determinar el efecto de su inoculación en condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El muestreo se realizó en la finca *El Mulato* en el municipio San José de las Lajas, Mayabeque. El maíz estaba cultivado en suelo Ferralítico Rojo Lixiviado Típico eútrico⁽⁹⁾ con *Phaseolus vulgaris* L. como cultivo precedente. Se establecieron cinco puntos de muestreo aleatorios y de cada uno de ellos se tomaron dos plantas, para un total de 10. La extracción se realizó tomando un volumen de suelo de 20 cm³ aproximadamente. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, por separado, y antes de las dos horas se conservaron en el laboratorio a 4 °C hasta su uso.

Aislamiento de *Stenotrophomonas* de la rizosfera de maíz

El aislamiento se realizó a partir de suelo rizosférico y rizoplano de plantas de maíz, siguiendo la metodología propuesta por Granada⁽⁵⁾. Para el aislamiento del suelo rizosférico, se pesaron muestras de 1 g y se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en agua destilada estéril. Se tomaron 100 µL de las suspensiones (10⁻⁴ – 10⁻⁶) y se sembraron por disseminación en medio LB con tres réplicas cada una. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h.

Para el aislamiento del rizoplano, se cortaron las raíces en porciones de 1 cm de largo y se colocaron en frascos Erlenmeyers con 10 mL de agua destilada estéril. Estos se mantuvieron en agitación durante 1 h a 150 rpm y se les aplicó la misma metodología del suelo rizosférico.

Las raíces cortadas se colocaron en placas con medio LB y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, se tomaron asadas del crecimiento bacteriano que se visualizó alrededor y sobre las raíces y se aislaron en el mismo medio con iguales condiciones.

Caracterización de *Stenotrophomonas* aislada de la rizosfera de maíz

Caracterización cultural y morfológica

Para la caracterización cultural se tuvo en cuenta la coloración, la mucosidad y la morfología de la colonia. Las que presentaron coloración translúcida, mucosidad ligera, bordes lisos y elevación plana ⁽⁵⁾, fueron purificadas mediante pases sucesivos por estría en medio LB. Luego se realizó la tinción de Gram y se seleccionaron los aislados gramnegativos, con morfología bacilar o cocobacilar y no esporulados, que posteriormente se sembraron por punción en los medios carentes de nitrógeno, Rennie y JMV. Los aislados que crecieron en estos medios se clasificaron como nitro fijadores.

Caracterización como PGPR

En este ensayo se evaluó la capacidad de los aislados para solubilizar fósforo y potasio, además se determinó la actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*.

La solubilización de fosfato se determinó en medio NBRIP utilizando el indicador púrpura de bromocresol; además se probaron tres fuentes de fósforo inorgánico diferentes: fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato de aluminio (AlPO_4) y fosfato de hierro (FePO_4). Las bacterias se sembraron por puntos de alrededor de 0,5 cm de diámetro a razón de cinco aislados por placa y se establecieron tres réplicas por cada uno. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Se tomaron como resultados positivos aquellos aislados que presentaron un halo amarillo alrededor del crecimiento, indicando la solubilización de las sales de fosfato.

Siguiendo el mismo procedimiento, se determinó la capacidad de solubilización de potasio en el medio Alexandrov, utilizando como fuentes de potasio el hidrógeno fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y el óxido de potasio (K_2O). Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h y se tomaron como resultados positivos los aislados que presentaron halo de solubilización alrededor de las colonias.

Para determinar la actividad antagónica frente a la cepa *Fusarium oxysporum* EC20-E-GM (perteneciente al cepario del laboratorio de fitopatología del Centro de Investigaciones

Biotecnológicas del Ecuador), se procedió al corte del micelio con bisturí estéril. Este fue colocado en tubo Falcon con 20 mL de agua destilada estéril y posteriormente se añadieron balines de acero esterilizados, de 4 mm de diámetro. Se agitó vigorosamente el frasco de forma manual durante 5 min y se filtró el contenido con un tamiz de 40 μm montado sobre un tubo Falcón estéril. Se sembraron por diseminación 200 μl de la solución tamizada en Agar Papa Dextrosa y sobre esto se sembraron los aislados bacterianos en forma de punto a razón de cuatro aislados por placa. La incubación fue a 28 °C durante siete días. Se tomaron como resultados positivos a la actividad antagonista los aislados que presentaron halo de inhibición del crecimiento fúngico con un radio mayor de 0,5 mm.

Identificación por secuenciación del gen ADNr 16S

Extracción del ADN genómico

La extracción del material genético se realizó por lisis alcalina. Se tomó una colonia del cultivo axénico y se colocó en Eppendorf con 40 μl de NaOH a 0,20 M. Posteriormente se calentó en microondas a 10 % de potencia de 700 W por un minuto e inmediatamente se enfrió en hielo durante 5 min. Las células lisadas se centrifugaron durante 10 min a 10,000 gravedades. Se tomó el sobrenadante y se realizó la cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría, utilizando el NanoDrop™ 2000 a 260 nm y se calculó la razón 260/280 y 260/230 en búsqueda de determinar la concentración y calidad del ADN, respectivamente.

Amplificación y secuenciación del ADNr 16S

Para la amplificación se utilizaron 25 μl de la mezcla de PCR que contenía 1 μl del extracto crudo conteniendo ADN, 1 μl (10 μM) de los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')⁽¹⁰⁾, que permiten obtener amplicones de alrededor de 1500 pb, y GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, USA). La amplificación se realizó en un termociclador MS mini (Major Science, USA) bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial 95 °C por 10 minutos y desnaturalización adicional de 1 minuto a 92 °C, 35 ciclos de 72 °C cada uno, durante 2 minutos. Los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (1 g de agarosa en 150 mL de buffer TAE 1X) a 80 V durante 45 min. La secuenciación se realizó por el método de Sanger en la compañía Macrogen®.

Edición de secuencias e identificación

Se realizó un análisis de calidad de las secuencias obtenidas mediante el programa FinchTV (ver. 1.4.0) (Geospiza Inc.) usando como criterio de aceptación un valor de calidad (Q) igual o superior a 20 por base. Posteriormente se analizaron usando el programa BLASTn⁽¹¹⁾. El valor de corte utilizado fue de 1×10^{-5} , con una cobertura mínima de aproximadamente el 80 %. La depuración y el alineamiento de las secuencias obtenidas se realizaron usando la herramienta de alineación de secuencias múltiples ClustalW⁽¹²⁾ en el programa MEGA-X (ver. 10.0.4)⁽¹³⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *Stenotrophomonas* de la rizosfera de maíz

Se obtuvieron 59 aislados totales, de los cuales el 72,9 % provino del rizoplaneo y el 27,1 % del suelo rizosférico de las plantas de maíz. La riqueza nutricional que representa el rizoplaneo lo convierte en una zona atractiva para el establecimiento de poblaciones microbianas. Los exudados radiculares, cuyas concentraciones son máximas a nivel de rizoplaneo, constituyen importantes fuentes de carbono para muchos microorganismos edáficos⁽¹⁴⁾.

Caracterización de *Stenotrophomonas* aislada de la rizosfera de maíz

Caracterización cultural y morfológica

Los 59 aislados obtenidos presentaron colonias planas, translúcidas, ligeramente mucosas y con bordes lisos, características semejantes a las descritas por Granada⁽⁵⁾. De estos, el 86,4 % (51 aislados) resultaron gramnegativas y, a su vez, el 94,1 % (48 aislados) coincidió con las especificaciones morfológicas propuestas para el género *Stenotrophomonas*: bacilos o cocobacilos gramnegativos, no esporulados. En el suelo se desarrollan muchos géneros bacterianos; sin embargo, en números absolutos, existe un predominio de bacterias gramnegativas sobre las grampositivas⁽¹⁵⁾. En el caso particular de la rizosfera, las raíces tienen una influencia directa en la composición y densidad de la microbiota del suelo. La liberación de sustancias orgánicas vegetales favorece el establecimiento de poblaciones microbianas heterótrofas que, en su mayoría, comprenden bacilos gramnegativos y actinomicetos⁽¹⁵⁾.

El género *Stenotrophomonas* presenta la capacidad de realizar la FBN, por lo que se utilizaron los medios Rennie y JMV para descartar aquellos aislados que no realizan esta función y el 41,7 % (20 aislados) crecieron en los medios. Los suelos Ferralíticos Rojos son los más comunes en la llanura Habana-Matanzas, zona que contempla el área muestreada. Por lo general, la productividad de estos suelos es alta debido a la profundidad y características de sus horizontes; sin embargo, son pobres en materia orgánica y presentan una baja fertilidad ⁽⁹⁾, lo cual puede traducirse en pobres concentraciones de nitrógeno. Estas características podrían favorecer la proliferación y actividad de microorganismos diazotróficos como *Stenotrophomonas*. La FBN ocurre en función de la concentración del elemento en el medio, respondiendo al principio de economía celular. La presencia de altas concentraciones de compuestos nitrogenados inhibe la síntesis de la nitrogenasa, enzima responsable del proceso, mediante la represión de la expresión de los genes *nif* que la codifican. De esta manera, el microorganismo utiliza preferentemente estos elementos como fuente de nitrógeno, en lugar de realizar un proceso que implica un alto consumo energético, como lo es la FBN. Por otro lado se plantea que cualquier deficiencia en los compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos, estimula la fijación microbiana de N₂ ^(16,17).

Los medios utilizados en el aislamiento de bacterias nitro fijadoras carecían totalmente de fuentes de nitrógeno e incluían en su composición, la sal molibdato de sodio dihidratado (Na₂MoO₄.2H₂O) como fuente de molibdeno, componente estructural de la enzima nitrogenasa ⁽¹⁷⁾. Ambos aspectos favorecieron la síntesis y actividad de la enzima y, por lo tanto, permitieron el crecimiento microbiano en estas condiciones.

Caracterización como PGPR

Los 20 aislados que mostraron la capacidad de realizar la FBN, crecieron en el medio NBRIP. La fuente de carbono presente en dicho medio es la glucosa, que constituye el azúcar más utilizado como fuente de carbono en los medios de cultivo y son pocos los microorganismos con la incapacidad de metabolizarla ⁽¹⁷⁾.

El 75 % (15 aislados) de estos aislados desarrollaron halo de solubilización frente a las diferentes fuentes de fósforo utilizadas (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización cualitativa como PGPR. Solubilización de fósforo, potasio y actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*

Aislados	Fuente de PO ₄ ⁻²			Fuente de K ⁺		Antagonismo
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	AlPO ₄	FePO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₂ O	
INCA-FRr1	+	+	+	+	+	+
INCA-FRr2	+	-	+	-	-	+
INCA-FRr3	+	+	+	Nc	nc	+
INCA-FRr4	-	-	+	Nc	nc	-
INCA-FRr5	+	-	+	+	+	-
INCA-FRr6	+	+	+	-	-	-
INCA-FRr7	+	+	+	Nc	nc	+
INCA-FRr8	+	-	+	Nc	nc	+
INCA-FRr9	+	+	+	Nc	nc	-
INCA-FRr10	-	-	-	-	-	-
INCA-FRr11	+	+	+	Nc	nc	-
INCA-FRr12	+	+	+	-	-	-
INCA-FRr13	+	-	+	Nc	nc	-
INCA-FRr16	+	+	+	Nc	nc	-
INCA-FRc1	-	-	-	-	-	-
INCA-FRc4	-	-	-	-	-	-
INCA-FRc8	-	-	-	-	-	-
INCA-FRc16	+	+	+	-	-	-
INCA-FRc19	-	-	-	-	-	-
INCA-FRc24	-	-	+	-	-	+

(+) Producción de halo de solubilización o halo de inhibición en caso del antagonismo; (-) crecimiento bacteriano sin formación de halo de solubilización o de inhibición en caso del antagonismo; (nc) no hubo crecimiento bacteriano

El fosfato de aluminio fue la fuente menos consumida, con nueve aislados; mientras que el fosfato tricálcico y el fosfato de hierro fueron más exitosos con 13 y 15 aislados, respectivamente. El contenido de hierro en los suelos Ferralíticos Rojos es elevado ⁽⁹⁾, por lo que es más probable que el fosfato establezca uniones con los iones férricos en comparación con otros iones y, a su vez, los microorganismos presentes en estos suelos estén más familiarizados con estos compuestos.

La formación de los halos de solubilización se produce como consecuencia del intercambio catiónico que realizan ácidos orgánicos secretados por las bacterias. Estos compuestos convierten el fosfato insoluble a formas solubles de la sal ⁽¹⁸⁾.

Por otro lado, la presencia o no del halo alrededor de la colonia no es criterio suficiente para clasificar a los microorganismos como solubilizadores de fósforo ⁽¹⁹⁾. La solubilización de sales de fósforo pudiera ocurrir por la unión de un agente quelante a los cationes, desplazando a los grupos fosfatos. Estas reacciones, aunque permiten la solubilización del fosfato no producen halo en el medio de cultivo; por lo que si bien no se puede descartar la posibilidad de que algunos de los aislados aquí estudiados no tengan la capacidad de solubilizar alguna de las sales de fosfato empleadas, sí pudieran existir aislados con potencialidades solubilizadoras y por la metodología empleada no se han podido determinar ⁽²⁰⁾.

En cuanto a la solubilización de potasio, el 60 % (12 aislados) crecieron en el medio Aleksandrov y de estos el 16,6 % (2 aislados) desarrollaron halo de solubilización. Este medio tiene como fuente de carbono y componente mayoritario la sacarosa, disacárido que no constituye la fuente de carbono más atractiva para la mayoría de los microorganismos. Algunos autores asocian la solubilización de potasio con la producción de ácidos de origen microbiano ⁽²¹⁾. Éste pudiera haber sido el mecanismo empleado para formar el halo de solubilización. Sin embargo, al igual que en la solubilización de fosfato, hay estudios que indican que esta ocurre sin la liberación de ácidos al medio y, por consiguiente, sin la disminución del pH ⁽²²⁾.

La actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum* fue positiva en el 30 % (6 aislados). El maíz en los ambientes tropicales es atacado por un gran número de patógenos que causan importantes daños económicos a su producción. Entre estos destacan especies del género *Fusarium* ⁽²³⁾ causantes de pudriciones de mazorca, que además de reducir el rendimiento son causa del deterioro y mala calidad de los granos y debido a la capacidad de producir micotoxinas, también están relacionadas con enfermedades en sus comensales ⁽²⁴⁾.

Identificación por secuenciación del gen ADNr 16S

Se identificaron cuatro géneros bacterianos pertenecientes al Phylum Proteobacteria, grupo especialmente abundante en la rizosfera durante los diferentes estadios fenológicos del maíz ^(25,26). Estos incluyeron a *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Stenotrophomonas* con un porcentaje de identidad mayor o igual a 97 en el 95 % de los casos (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las secuencias obtenidas, con la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLASTn

Aislado	Especie putativa	Identidad
INCA-FRr16	<i>Enterobacter bugandensis</i>	99 %
INCA-FRr5	<i>Pseudomonas brenneri</i>	98 %
INCA-FRr3	<i>Pseudomonas gessardii</i>	99 %
INCA-FRr2	<i>Pseudomonas graminis</i>	99 %
INCA-FRr4	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	97 %
INCA-FRr8	<i>Pseudomonas putida</i>	100 %
INCA-FRr9	<i>Pseudomonas</i> sp.	100 %
INCA-FRr11	<i>Pseudomonas</i> sp.	99 %
INCA-FRc4	<i>Rhizobium aegyptiacum</i>	100 %
INCA-FRc1	<i>Rhizobium mesosinicum</i>	99 %
INCA-FRc8	<i>Rhizobium mesosinicum</i>	99 %
INCA-FRr10	<i>Rhizobium</i> sp.	88 %
INCA-FRc19	<i>Rhizobium</i> sp.	99 %
INCA-FRr12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100 %
INCA-FRr13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100 %
INCA-FRc16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98 %
INCA-FRr7	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	98 %
INCA-FRc24	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99 %
INCA-FRr1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99 %
INCA-FRr6	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100 %

Los géneros más representativos fueron *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, para un 35 % del total en cada caso (7 aislados). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores ⁽⁶⁾ en rizosfera de *Daucus carota* L. En menor medida se identificaron los géneros *Rhizobium* y *Enterobacter* con un 25 % (5 aislados) y 5 % (1 aislado) de aparición, respectivamente.

Es común encontrar reportes de patogenicidad asociado a los géneros *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, en humanos, en animales e incluso en plantas ⁽²⁷⁻³⁰⁾. Sin embargo, en muchas ocasiones, la presencia de factores de virulencia y la patogenicidad de los microorganismos se restringen a especies, e incluso a cepas específicas dentro de un género ⁽¹⁷⁾. El carácter patogénico que pudieran presentar algunos de estos géneros, no resta mérito a las potencialidades bioestimulantes que desarrollan en plantas; aunque no quedan eximidos de los exámenes eco-toxicológicos establecidos para la explotación agrícola de microorganismos.

El género *Pseudomonas* se ha reportado ampliamente como PGPR de diversas plantas incluyendo las gramíneas ^(5,6,15,31). Es frecuente que las poblaciones de *Pseudomonas* sobresalgan por encima de otros géneros diazotróficos, debido a su corto período de latencia, rápida tasa de crecimiento y versatilidad metabólica ⁽³²⁾. Por otro lado, *Enterobacter* se ha descrito como microorganismo rizosférico y sobre todo, como endófito de diferentes especies vegetales; destacando por sus características como promotores del crecimiento ^(33,34).

En el caso del género *Rhizobium*, se han realizado aislamientos como endófitos de maíz ⁽³⁵⁾ y en menor medida, de la rizosfera ⁽³⁶⁾, fundamentalmente en suelos donde se aplica el sistema de rotación de cultivo con alguna especie leguminosa. El uso de *Phaseolus vulgaris* L. como cultivo de rotación en este estudio, pudo haber favorecido el establecimiento de poblaciones de rizobios, puesto que esta leguminosa presenta mayor susceptibilidad a la colonización y establecimiento de la simbiosis con especies del género *Rhizobium*, con respecto a otros géneros de rizobios ⁽³⁷⁾.

Stenotrophomonas se ha aislado de diversos ambientes, desde diferentes tipos de suelos hasta tractos intestinales de animales ⁽³⁸⁾, lo cual resalta el carácter ubicuo de esta bacteria. La especie *Stenotrophomonas pavanii* se utiliza en procesos de biorremediación a nivel industrial ⁽³⁹⁾ y agrícola ⁽⁴⁰⁾, mientras que *Stenotrophomonas maltophilia* tiene un comportamiento contrastante en los diferentes hábitats que ocupa.

Esta especie es común en ambientes intrahospitalarios y algunas cepas están descritas como potentes agentes nosocomiales; sin embargo, se describe como parte de la microbiota edáfica normal y se asocia a muchos cultivos de interés agrícola sin ocasionar daños a los mismos ⁽⁴¹⁾. De igual forma ocurre con *Stenotrophomonas rhizophila*, que muestra un gran potencial para promover el crecimiento de las plantas como la soya ⁽⁴²⁾, algodón, tomate y pimiento entre otros; y es considerada microbiota planctónica de ambientes marinos ⁽⁴³⁾.

En este estudio el aislado más integral en cuanto a los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal evaluados, fue INCA-FRr1, identificado como *Stenotrophomonas rhizophila*. La capacidad de solubilizar diferentes fuentes de fósforo y potasio, de realizar la FBN y la actividad antagónica frente a fitopatógenos, además de otras características positivas que no se demostraron en este estudio pero que son conocidas ⁽⁶⁾; representan ventajas claras con respecto a otros géneros bacterianos rizosféricos ⁽⁴³⁾; por el contrario, utilizan una cepa de *Stenotrophomonas rhizophila* que no presenta la capacidad de realizar

la FBN y aun así obtienen resultados importantes en cuanto a desarrollo de variables como: altura, longitud de tallo y raíz, biomasa seca área y foliar en plantas de albahaca.

Esto podría sugerir la presencia de otros mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. En ensayos de co-inoculación de *Stenotrophomonas rhizophila* con Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), en comparación con las inoculaciones simples, se percibe un aumento en el crecimiento de las plantas y en el contenido de clorofilas ⁽⁴⁴⁾; por consiguiente, la bacteria también es calificada como potenciadora de la micorrización (termino conocido como Mycorrhiza Helper Bacteria, MHB) ^(45,46).

El éxito de la utilización de bioproductos radica, entre otros aspectos, en la obtención de cepas compatibles al cultivo en cuestión ⁽⁴⁷⁾ y eficientes para la lograr los rendimientos deseados. De esta forma, la utilización de PGPR nativas como inoculantes, promueve el manejo ecológico-sostenible de los agroecosistemas y podría mejorar la producción de maíz. La capacidad de las cepas nativas para interactuar positivamente con la microbiota edáfica residente y su adaptabilidad a las condiciones climáticas y agroecológicas locales, a menudo potencia su rendimiento en comparación con cepas alóctonas.

CONCLUSIONES

- En la rizosfera de maíz cultivado en suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico-eútrico, de la provincia de Mayabeque, coexisten poblaciones bacterianas diazotróficas correspondientes a los géneros *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Enterobacter*. De manera integral, el aislado INCA-FRr1 correspondiente al género *Stenotrophomonas*, sobresale por sus características promotoras del crecimiento vegetal y podría constituir un inoculante promisorio para cultivos de interés agrícola y para el propio cultivo del maíz.
- El estudio de la rizosfera y el conocimiento de su composición microbiana, es clave para la concepción de productos biológicos eficientes y compatibles dentro de una agricultura sostenible.

BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. Nota informativa de la FAO sobre la oferta y la demanda de cereales [Internet]. 2019. Available from: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
2. Martín GM, Rivera R. Influencia de la inoculación micorrízica en los abonos verdes. Efecto sobre el cultivo principal. Estudio de caso: el maíz. *Cultivos Tropicales*. 2015;36(especial):34–50.
3. Khaitov B, Kurbonov A, Abdiev A, Adilov M. Effect of chickpea in association with *Rhizobium* to crop productivity and soil fertility. *Eurasian Journal of Soil Science*. 2016;5(2):105–12. doi:10.18393/ejss.2016.2.105-112
4. Colás A. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*. 2014;62:105–12.
5. Granada-Mora KI, González R, Alvarado Y, Robles AR, Torres R. Caracterización de rizobacterias y estimulación de parámetros morfológicos y biomasa en maíz (*Zea mays* L.). *Centro de Biotecnología*. 2015;4(1):14–22.
6. Gavia-Giraldo J, Restrepo-Franco G, Galeano-Vanegas N, Hernández-Rodríguez A. Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L. *Ciencia y Agricultura*. 2018;15(1):19–27. doi:10.19053/01228420.v15.n1.2018.7753
7. Ramírez C, Soto Z, Castro L, Arauz LF, Uribe-Lorío L, Uribe L. Efecto de cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento sobre la pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile dulce (*Capsicum annuum*). *Agronomía Costarricense*. 2015;39(3):87–100.
8. Patil C, Suryawanshi R, Koli S, Patil S. Improved method for effective screening of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 2016;131:102–4. doi:10.1016/j.mimet.2016.10.009
9. Hernández A, Pérez JM, Bosch D. Clasificación de los suelos de Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba: Ediciones INCA; 2015.
10. Criollo PJ, Obando M, Sánchez L, Bonilla R. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano

- cundiboyacense. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2012;13(2):189–95. doi:10.21930/rcta.vol13_num2_art:254
11. Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(Database issue):D30-5. doi:10.1093/nar/gku1216 [doi]
 12. Gómez E, Ruiz-Díez B, Fajardo S, Eichler-Loebermann B, Samson R, van Damme P, et al. Caracterización de rizobios aislados de nódulos de frijol Caupí, en suelos salinos de Cuba. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(4):39–49.
 13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz Ch, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(6):1547–9. doi:10.1093/molbev/msy096
 14. Kuzyakov Y, Blagodatskaya E. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept and review. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015;83:184–99. doi:10.1016/j.soilbio.2015.01.025
 15. Tchakounté GVT, Berger B, Patz S, Fankem H, Ruppel S. Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. *Microbiological Research*. 2018;214:47–59. doi:10.1016/j.micres.2018.05.008
 16. Iyer B, Rajkumar S. In Reference Module in Life Sciences [Internet]. Gujarat, India: Elsevier Inc.; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13104-8>
 17. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms*. 15th Global Edition. USA: Pearson; 2018. 1064 p.
 18. Zheng BX, Ibrahim M, Zhang DP, Qing-Fang B, Hong-Zhe L, Guo-Wei Z, et al. Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. *AMB Expr*. 2018;47(8):1–12. doi:10.1186/s13568-018-0575-6
 19. Bashan Y, Salazar B, Moreno M, Lopez R, Linderman R. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management*. 2013;102:26–36. doi:10.1016/j.jenvman.2011.12.032

20. Buono NI, Ulla EL. Efectos de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) en condiciones controladas. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*. 2016;36(2):45–54.
21. Singh S, Ram B, Bahadur I. Solubilization of Potassium Containing Various K-Mineral Sources by K-Solubilizing Bacterial Isolates on Aleksandrov Medium. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018;7(3):1142–51. doi:10.20546/ijcmas.2018.703.136
22. Etesami H, Emami S, Alikhani HA. Potassium solubilizing bacteria (KSB):: Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. *Journal of soil science and plant nutrition*. 2017;17(4):897–911.
23. Ortiz-Bustos CM, García-Carneros AB, Molinero-Ruiz L. La marchitez tardía del maíz (*Zea mays* L.) causada por *Cephalosporium maydis* en la Península Ibérica, y otros hongos asociados. *Summa Phytopathologica*. 2015;41(2):107–14. doi:10.1590/0100-5405/1998
24. García-Aguirre G, Martínez-Flores R. Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2010;81(16):15–20.
25. Johnston-Monje D, Lundberg DS, Lazarovits G, Reis VM, Raizada MN. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. *Plant and Soil*. 2016;405:337–355. doi:10.1007/s11104-016-2826-0
26. Correa-Galeote D, Bedmar EJ, Fernández-González AJ, Fernández-López M, Arone GJ. Bacterial Communities in the Rhizosphere of Amilaceous Maize (*Zea mays* L.) as Assessed by Pyrosequencing. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1–8. doi:10.3389/fpls.2016.01016
27. Rufián J, Macho A, Corry D, Mansfield J, Ruiz-Albert J, Arnold D, et al. Confocal microscopy reveals in planta dynamic interactions between pathogenic, avirulent and non-pathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Molecular Plant Pathology*. 2018;19(3):537–51. doi:10.1111/mpp.12539
28. Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA, Filloux A. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*. 2018;41:15–20. doi:10.1016/j.mib.2017.11.006

29. Sánchez C, Razón R, Ramos LT, Barreiro B, Reyes C, Cantillo H, et al. Fibrosis quística en niños y su seguimiento durante 40 años (1977-2017). *Revista Cubana de Pediatría*. 2019;91(3):1–15.
30. Welker M, Van Belkum A, Girard V, Charrier JP, Pincus D. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert review of Proteomics*. 2019;16(8):695–710. doi:10.1080/14789450.2019.1645603
31. Yang Y, Wang N, Guo X, Zhang Y, Ye B. Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. *PLoS One*. 2017;12(5):e0178425. doi:10.1371/journal.pone.0178425
32. Wang Y, Zhang X, Wang L, Wang C, Fan W, Wang M, et al. Effective biodegradation of pentachloronitrobenzene by a novel strain *Pseudomonas putida* QTH3 isolated from contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;30(182):109463. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109463.
33. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascarua-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, Fuentes-Ramírez LE, et al. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* sp. as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología*. 2011;43(4):287–93. doi:10.1590/S0325-75412011000400009
34. Witzel K, Gwinn-Giglio M, Nadendla S, Shefchek K, Ruppel S. Genome Sequence of *Enterobacter radicincitans* DSM16656T, a Plant Growth-Promoting Endophyte. *Journal of Bacteriology*. 2012;194(19):5469–5469. doi:10.1128/JB.01193-12
35. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. *Rhizobium* etli maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archive of Microbiology*. 2004;181(5):337–44.
36. López-Reyes L. The bacterial diversity in *Zea mays* L: A critical review. *Maydica*. 2015;60(2):1–11.
37. Dall’Agnol RF, Ribeiro RA, Ormeno-Orrillo E, Rogel MA, Delamuta JRM, Andrade DS, et al. *Rhizobium* freirei sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63(11):4167-4173. doi:10.1099/ijs.0.052928-0
38. Kenzaka T, Tani K. Draft Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas pavanii* BWK1, Isolated from *Mareca penelope* Feces. *Microbiology Resource Announcements* [Internet]. 2018;6(12). doi:10.1128/genomeA.00187-18

39. Mehmood Ch, Qazi I, Hashmi I, Bhargava S, Deepa S. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) modified with dye sensitized titania and starch blend using *Stenotrophomonas pavanii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2016;113:276–86. doi:10.1016/j.ibiod.2016.01.025
40. Bhattacharya S, Das A, Srividya S, Prakruti P, Priyanka N, Sushmitha B. Prospects of *Stenotrophomonas pavanii* DB1 in diesel utilization and reduction of its phytotoxicity on *Vigna radiata*. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;1–10. doi:10.1007/s13762-019-02302-w
41. An Sh, Berg G. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends in microbiology*. 2018;26(7):637–8. doi:10.1016/j.tim.2018.04.006
42. Egamberdieva D, Jabborova D, Berg G. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. *Plant and soil*. 2016;405(1–2):35–45. doi:10.1007/s11104-015-2661-8
43. Chiquito-Contreras RG, Solis-Palacios R, Reyes-Pérez JJ, Reyes J, Murillo-Amador B, Alexandre-Rosas J, et al. Growth promotion of sweet basil by arbuscular mycorrhizal fungi and a marine bacterium. *Growth*. 2018;28(6):68–76. doi:10.15174/au.2018.2086
44. Long L, Lin Q, Yao Q, Zhu H. Population and function analysis of cultivable bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *3 Biotech*. 2017;7(1):8. doi:10.1007/s13205-017-0612-1
45. Kataoka R, Futai K. A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. *Biology and fertility of soils*. 2009;45(3):315–20. doi:10.1007/s00374-008-0340-0
46. Bidondo L, Colombo R, Bompadre J, Benavides M, Scorza V, Silvani V, et al. Cultivable bacteria associated with infective propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. Implications for mycorrhizal activity. *Applied Soil Ecology*. 2016;105:86–90. doi:10.1016/j.apsoil.2016.04.013
47. Hernández A, Rives N, Caballero A, Hernández AN, Heydrich M. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de compuestos indólicos, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2004;6(1):6–13.