

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

## Influencia de la aplicación de *Azospirillum lipoferum* en *Megathyrsus maximus* vc. guinea tobiatá en un suelo Pardo Grisáceo

### *The influence of application of Azospirillum lipoferum in Megathyrsus maximus vc. guinea tobiatá in Pardo Grisáceo soil*

Lázaro J. Ojeda-Quintana<sup>1</sup>, Layda Toledo-Vazquez<sup>2</sup>, Consuelo Hernández-Rodríguez<sup>2</sup>, Yoandy Machado-Díaz<sup>2</sup> y Eduardo Furrázola-Gómez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CUM Cumanayagua, Universidad de Cienfuegos, Calle Los Filtros No. 18, Cumanayagua, Cienfuegos, Cuba

<sup>2</sup> Estación Experimental de Suelos y Fertilizantes Escambray, Barajagua, Cumanayagua, Cienfuegos, Cuba

<sup>3</sup> Instituto de Ecología y Sistemática. CITMA.

Correo electrónico: ljojeda@ucf.edu.cu

**RESUMEN:** Durante dos años se realizó un estudio en la Estación Experimental de Suelos y Fertilizantes Escambray (ubicada en la provincia de Cienfuegos, Cuba), con el fin de evaluar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de *Azospirillum lipoferum* en *Megathyrsus maximus* vc. guinea tobiatá. Para ello se empleó un diseño de bloques al azar, con siete tratamientos y tres réplicas. Los tratamientos fueron: dosis de aplicación del biofertilizante (L ha<sup>-1</sup>): 25, 50, 75, 100 y 125; un testigo con NPK en la siembra (45 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno en cortes alternos); y un control absoluto. Las parcelas medían 16 m<sup>2</sup>, con un área evaluable de 9 m<sup>2</sup>. La cepa de *A. lipoferum* utilizada fue INICA-8, con una concentración promedio de 10<sup>8</sup> ufc g<sup>-1</sup> de semilla. Se realizaron cuatro cortes por año, con una frecuencia de 90 días, a una altura sobre el suelo de 25 cm, y en cada corte se evaluó el rendimiento de materia seca. La aplicación de *A. lipoferum* tuvo una influencia favorable en el establecimiento del pasto; el rendimiento acumulado fue de 27,91; 28,34; 30,17; 30,23 y 31,92 t de MS ha<sup>-1</sup> para 25, 50, 75, 100 y 125 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente, con diferencia significativa del control. El mayor rendimiento de MS se encontró en el testigo fertilizado (54,45 t de MS ha<sup>-1</sup>), que difirió significativamente del resto de los tratamientos. Se concluye que este biopreparado puede ser una alternativa a la fertilización mineral.

Palabras clave: abonos orgánicos, bacteria fijadora del nitrógeno, rendimiento

**ABSTRACT:** A study was conducted during two years at the Soils and Fertilizers Research Station Escambray (located in the Cienfuegos province, Cuba), in order to evaluate the effect of the application of different doses of *Azospirillum lipoferum* in *Megathyrsus maximus* cv. guinea tobiatá. For such purpose a randomized block design was used, with seven treatments and three replications. The treatments were: doses of application of the biofertilizer (L ha<sup>-1</sup>): 25, 50, 75, 100 and 125; a control with NPK at planting (45 kg ha<sup>-1</sup> of nitrogen in alternate cuttings); and an absolute control. The plots measured 16 m<sup>2</sup>, with an evaluable area of 9 m<sup>2</sup>. The *A. lipoferum* strain used was INICA-8, with an average concentration of 10<sup>8</sup> cfu g<sup>-1</sup> of seed. Four cuttings per year were made, with a frequency of 90 days, at a height above the soil of 25 cm, and in each cutting the dry matter yield was evaluated. The application of *A. lipoferum* had a favorable influence on the pasture establishment; the accumulated yield was 27,91; 28,34; 30,17; 30,23 and 31,92 t DM ha<sup>-1</sup> for 25, 50, 75, 100 and 125 L ha<sup>-1</sup>, respectively, with significant difference from the control. The highest DM yield was found in the fertilized control (54,45 t DM ha<sup>-1</sup>), which differed significantly from the other treatments. It is concluded that this biopreparation can be an alternative to mineral fertilization.

Keywords: organic fertilizers, nitrogen fixing bacteria, yield

## INTRODUCCIÓN

La agricultura, a nivel mundial, constituye una actividad fundamental para la subsistencia de la población humana. Diversos factores han conducido a un proceso de deterioro de sus escasos recursos y a una creciente dificultad para renovarlos. El suelo como base de los recursos y de la producción se encuentra enmarcado en un ambiente complejo, heterogéneo y frágil, que evidencia una alta susceptibilidad a la erosión y una baja fertilidad natural, con efectos sobre la producción de los cultivos, la productividad del trabajo y la factibilidad del establecimiento de sistemas productivos sustentables. La recuperación y mantenimiento de la fertilidad de los suelos sobre una base sostenible constituye un factor de gran importancia en el desarrollo de la producción agropecuaria mundial (Rueda-Puente *et al.*, 2015).

El objetivo de las estrategias de manejo de los nutrientes es lograr en los cultivos la producción requerida, de una manera eficiente, económica y sustentable. A nivel mundial existe consenso acerca de que la agricultura basada en la dependencia exclusiva de insumos químicos no es sustentable a largo plazo, y que solo involucrando la combinación de fertilizantes orgánicos, abonos verdes y biofertilizantes será posible lograr una producción sostenible de alimentos, mantener la biodiversidad del suelo y evitar la contaminación del ambiente (Aguirre-Medina *et al.*, 2010).

Los biofertilizantes se consideran una alternativa para sustituir parcial o totalmente los fertilizantes minerales, y el empleo de bacterias que interactúan con las plantas resulta una opción viable en muchos países. En la actualidad se busca el desarrollo de biofertilizantes con el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en particular del género *Azospirillum*, el cual fija nitrógeno y produce fitohormonas (Ferlini, 2008).

La primera especie del género *Azospirillum* fue aislada por Beijerinck en 1925, en Holanda, a partir de suelos pobres en nitrógeno, y se llamó originalmente *Spirillum lipoferum*. Desde entonces, se han aislado cepas de este género a partir de numerosas especies de pastos silvestres y cultivados, de cereales y de leguminosas en climas tropicales y subtropicales, según informaron Rueda-Puente *et al.* (2015). Esta bacteria ha progresado en los campos, dando lugar a una aplicación cada vez mayor y exitosa en varias regiones del mundo, especialmente en América del Sur y Centroamérica (Hartmann y Bashan, 2009).

En este estudio se evaluó la aplicación de diferentes dosis de *Azospirillum lipoferum* en *Megathyrsus maximus* vc. guinea tobiatá, en condiciones de campo, como una opción para mejorar el rendimiento de materia seca de esta especie de pasto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó durante dos años, en un suelo Pardo Grisáceo (Hernández *et al.*, 1999), en parcelas de 16 m<sup>2</sup> sembradas con *M. maximus* vc. guinea tobiatá. Los principales indicadores de la fertilidad del suelo mostraron los siguientes valores: pH (KCl): 5,4 método potenciométrico (Oficina Nacional de Normalización, 1999c); P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 4,71 mg/100 g de suelo método colorimétrico de Oniani (Oficina Nacional de Normalización, 1999b); K<sub>2</sub>O: 13,1 mg/100 g de suelo por fotometría de llama según el método colorimétrico de Oniani (Oficina Nacional de Normalización, 1999b); materia orgánica: 1,24 % según el método Walkley-Black (Oficina Nacional de Normalización, 1999a); y nitrógeno total: 0,185 %.

Se empleó un diseño de bloques al azar con siete tratamientos y tres réplicas. Los tratamientos evaluados fueron: dosis de aplicación del biofertilizante (L ha<sup>-1</sup>): 25, 50, 75, 100 y 125; un testigo con NPK en la siembra (45 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno en cortes alternos); y un control absoluto.

La cepa de *A. lipoferum* utilizada fue la INICA-8, con una población de 10<sup>7</sup> ufc g<sup>-1</sup> de semilla.

En la siembra se empleó semilla botánica, con 96 % de germinación. El biofertilizante se aplicó sobre la semilla en el momento de la siembra; después del corte de establecimiento (corte cero), y posteriormente en cortes alternos. Se hicieron cuatro cortes por año, con una frecuencia de 90 días, a una altura de 25 cm sobre el suelo. Se aplicó NPK después de la siembra, a razón de 45 kg de N ha<sup>-1</sup>, 40 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> y 120 kg de K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>; posteriormente se aplicó N en similar dosis, en cortes alternos. Los portadores químicos empleados fueron nitrato de amonio, superfosfato simple y cloruro de potasio.

En cada corte se midió el rendimiento de masa seca (t ha<sup>-1</sup>). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA, y cuando *F* resultó significativamente diferente las medias se compararon según la prueba de rango múltiple de Duncan (1955).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La influencia de la aplicación de *Azospirillum* en el establecimiento del pasto se muestra en la figura 1. El rendimiento de materia seca en relación con el control absoluto resultó estadísticamente su-

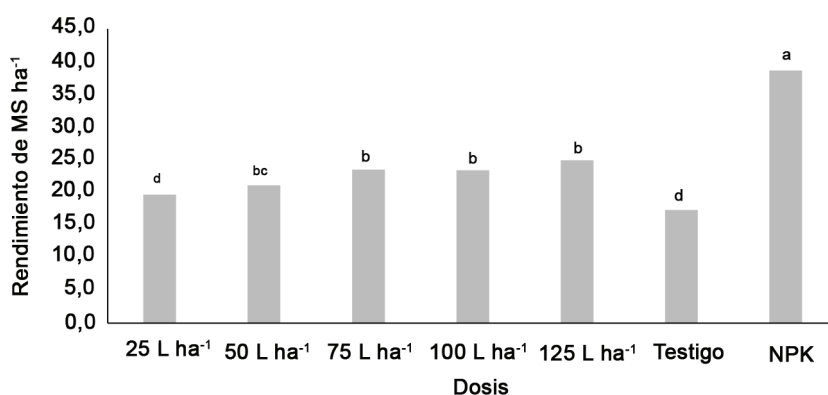


Fig. 1. Rendimiento de masa seca (t ha<sup>-1</sup>) de *M. maximus* vc. guinea tobiatá en el corte de establecimiento.

perior en los tratamientos inoculados con el biopreparado, con incrementos crecientes de acuerdo con el aumento de las dosis empleadas (13,7; 21,8; 35,7; 35,2 y 44,0 %, respectivamente). El mayor contenido de materia seca se obtuvo con la aplicación inicial de NPK, que difirió de todos los tratamientos. Esta respuesta en el establecimiento no necesariamente se le puede atribuir al biopreparado, sino al proceso de adaptación del *Azospirillum* en el suelo, por lo que debe tenerse en cuenta el efecto sinérgico de las relaciones fisiológicas que se manifiestan en el propio pasto, el organismo inoculado y la fenología de la planta. Hubo evidencias de una germinación más precoz en todos los tratamientos inoculados en relación con el testigo.

La capacidad de *Azospirillum* para colonizar la rizosfera puede depender de algunas propiedades de la bacteria, como la quimiotaxis hacia los exudados de la raíz, un metabolismo versátil que incluye la fijación de nitrógeno, el antagonismo y la competencia con los microorganismos. En tal sentido, resulta importante su habilidad para unir las raíces de las plantas y las partículas del suelo, lo que sugiere que la unión de *Azospirillum* a las raíces involucra dos fases distintas: adsorción y anclaje (De-Bashan *et al.*, 2010).

Las especies *A. lipoferum* y *Azospirillum brasilense* se caracterizan por su motilidad y respuesta a factores quimiotáxicos, y por permanecer durante un largo período en la rizosfera de los cultivos. Estas características les confieren facilidad para competir con la microflora nativa; por ello se pueden encontrar en un gran número de suelos tropicales, incluso en tundras y sitios semidesérticos (Díaz-Franco y Ortigón-Morales, 2006; García-Olivares *et al.*, 2012). Estos criterios deben ser

tomados en cuenta para considerar la estabilidad del microorganismo en el suelo y su influencia en el establecimiento de *M. maximus* vc. guinea tobiatá.

La mayoría de las investigaciones dirigidas a mejorar la respuesta vegetal se han basado en el uso de bacterias nativas fijadoras de nitrógeno en cereales y forrajes, y recientemente se han incluido otras plantas, así como el empleo de productos biológicos comerciales. En ciertas circunstancias, la cantidad de nitrógeno fijado por estos microorganismos puede ser significativa, pero no explica por sí misma el incremento del crecimiento de las plantas. En numerosos ensayos se ha comprobado que *Azospirillum* produce un incremento radicular altamente significativo en la etapa inicial de las plantas en cultivo (Ramírez-Elias *et al.*, 2014), y ello puede influir en una mejor respuesta en la fase de establecimiento del pasto, como lo corroboran los resultados expuestos con anterioridad.

Varios autores se refieren a la importancia del período posterior a la inoculación para la sobrevivencia de los microorganismos en el suelo, donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos y raíces de las plantas. Reportes de investigaciones indican que solamente aquellos organismos capaces de trasladarse de las semillas a la raíces e incrementar su biomasa en la rizosfera pueden ser considerados colonizadores competitivos de las raíces (De-Bashan *et al.*, 2007).

Con el objetivo de encontrar esta bacteria «ideal», se consideró importante estudiar diferentes asociaciones entre bacterias beneficiosas y tipos de plantas. *Azospirillum* mostró los mejores resultados y, por ello, puede servir como modelo para todas las bacterias asociativas y otros grupos bacterianos,

tales como cianobacterias, bacterias solubilizadoras de fosfato y bacterias sulfoxidantes (Trejo *et al.*, 2012). Los consorcios de microorganismos aparentemente funcionan mejor cuando se incluyen bacterias solubilizadoras de fosfatos, *Azotobacter*, rizobios, bacilos y hongos micorrízico-arbusculares (MA). Esto se explica por los efectos sinérgicos de cada uno de ellos en el aumento de la disponibilidad de nutrientes y la inactivación de compuestos inhibitorios, actividades que coadyuvan a un mejor crecimiento de las plantas.

El rendimiento de MS acumulada se presenta en la tabla 1.

Fue evidente la respuesta del biofertilizante en relación con el testigo absoluto en los períodos evaluados y en el acumulado; en este último, el incremento del rendimiento de materia seca fue de 42,4; 44,6; 54,0; 54,3 y 62,9 % para 25, 50, 75, 100 y 125 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre las dosis. Una valoración económica preliminar presupone la factibilidad de emplear *A. lipoferum* como alternativa de biofertilización ante la carencia de fertilizantes minerales que sufren los pastos. Teniendo en cuenta el aumento significativo del rendimiento de materia seca respecto al control absoluto y el costo creciente de los fertilizantes minerales sintéticos, se puede evaluar la coinoculación de *Azospirillum* con otros biofertilizantes, como las micorrizas y los microorganismos eficientes, y también la aplicación de dosis bajas de fertilizantes minerales para tratar de aumentar el contenido de materia seca.

Los resultados coinciden con lo hallado por Cuesta-Muñoz *et al.* (2005) en la región del Caribe seco colombiano, en un suelo con pH cercano a la

neutralidad y bajo contenido de materia orgánica, donde *M. maximus* alcanzó una alta productividad de materia seca (alrededor de 12 a 18 t ha<sup>-1</sup>) debido a la fijación biológica del nitrógeno y al efecto de las fitohormonas, cuando se inocularon cepas de *Azospirillum* para suplir las fuentes de nitrógeno de origen sintético. En otros cultivos como el trigo, el sorgo y el maíz (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009) la inoculación de semillas con *Azospirillum* mostró un efecto positivo en la longitud de la espiga (7-30 %) y en la producción de espiguillas fértiles (12-25 %).

Huerta *et al.* (2008) señalaron que dentro de los biofertilizantes se agrupan aquellos que tienen como base microorganismos que viven normalmente en el suelo en poblaciones bajas, y que, al aumentarse por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas una cantidad importante de elementos nutritivos mediante su actividad biológica; por ello, el determinar la presencia de *Azospirillum* en el tipo de suelo donde se realizó la investigación podría corroborar lo planteado por estos autores.

La respuesta favorable de *M. maximus* vc. guinea tobiatá a la inoculación se alcanzó en un suelo con pH de 5,4 (medianamente ácido), lo que no se corresponde con lo informado por Sánchez (citado por Rivera-Botía, 2008), quien planteó que el género *Azospirillum* presenta un crecimiento óptimo en rango de pH de 6,5-7,0, y señaló además que para *A. brasilense* dicho rango es de 6,0-7,8; *A. lipoferum*, 5,7-6,8; *Azospirillum amazonense*, 5,7-6,5; *Azospirillum halopraeferens*, 6,0-8,0; y *Azospirillum doebereineriae*, 6,0-7,0, lo que significa que a pesar de estar fuera del rango recomendado, *Azospirillum*

Tabla 1. Efecto de la aplicación del *Azospirillum* en el rendimiento de materia seca.

Tratamiento	Período poco lluvioso		Período lluvioso		Acumulado	
	MS (t ha <sup>-1</sup> )	Incremento (%)	MS (t ha <sup>-1</sup> )	Incremento (%)	MS (t ha <sup>-1</sup> )	Incremento (%)
25 L ha <sup>-1</sup>	6,32 <sup>c</sup>	40,1	21,59 <sup>bc</sup>	43,1	27,91 <sup>b</sup>	42,4
50 L ha <sup>-1</sup>	7,21 <sup>bc</sup>	59,8	21,13 <sup>bc</sup>	40,1	28,34 <sup>b</sup>	44,6
75 L ha <sup>-1</sup>	7,18 <sup>bc</sup>	59,2	22,99 <sup>bc</sup>	52,4	30,17 <sup>b</sup>	54,0
100 L ha <sup>-1</sup>	7,31 <sup>bc</sup>	62,0	22,92 <sup>bc</sup>	52,8	30,23 <sup>b</sup>	54,3
125 L ha <sup>-1</sup>	7,51 <sup>bc</sup>	66,5	24,41 <sup>b</sup>	61,8	31,92 <sup>b</sup>	62,9
Control absoluto	4,51 <sup>d</sup>	-	15,08 <sup>c</sup>	-	19,59 <sup>c</sup>	-
Testigo fertilizado (NPK)	11,63 <sup>a</sup>	-	42,82 <sup>a</sup>	-	54,45 <sup>a</sup>	-
ES ±	0,3817**	-	1,9118**	-	1,9901**	-

Valores con superíndices no comunes difieren a  $p < 0,05$  (Duncan, 1955) \*\*  $p < 0,01$

encontró condiciones para su establecimiento que le permitieron influir favorablemente en el pasto inoculado.

Los estudios de más de veinte años indican que las bacterias del género *Azospirillum* tienen una especial afinidad por las raíces de las gramíneas (Brasil *et al.*, 2005), como es el caso de los pastos, que responden con incrementos en su crecimiento y en el rendimiento cuando son inoculados con *Azospirillum* spp. La secreción de sustancias promotoras del crecimiento de las plantas (tales como auxinas, giberelinas y citoquininas) por *Azospirillum* parece estar involucrada parcialmente en este efecto (Reis Junior *et al.*; Radwan *et al.*; Kuss *et al.*, citados por (Cárdenas *et al.*, 2010).

En la región del Caribe seco colombiano, Cárdenas (2007) aisló cepas de *Azospirillum* con el fin de evaluar su efecto en semillas de *M. maximus* cv. Tanzania, en inoculación simple y en coinoculación con una cepa fosfatolubilizadora de *Enterobacter agglomerans* (UV1), aislada de suelos aldoneros del Cesar. Esta inoculación aumentó hasta 20 % la proteína cruda y 45 % la materia seca, respecto a plantas fertilizadas con fuentes nutricionales químicas en condiciones de invernadero. En la presente investigación el rendimiento de materia seca superó el 40 %, lo que avala la respuesta favorable de *M. maximus* a la inoculación con *Azospirillum*.

Otros autores informan que la inoculación con *A. brasilense* es altamente beneficiosa en gramíneas como el maíz, la caña de azúcar, los pastos y el sorgo, debido a que aporta de 30 a 50 % de nitrógeno a dichos cultivos. Además de fijar nitrógeno, esta bacteria es capaz de producir hormonas de crecimiento vegetal como ácido indolacético (AIA), que genera un crecimiento importante del sistema radicular, con una mayor absorción, incluso, de los propios fertilizantes minerales aplicados (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008).

Los inoculantes microbianos representan una nueva tecnología que contribuye a mejorar la productividad del sistema agropecuario a largo plazo. Esta puede ser considerada como una tecnología limpia, alineada con los principios de la agricultura sustentable y opuesta al aumento abusivo de la utilización de pesticidas y fertilizantes en estos últimos tiempos. Varios microorganismos se emplean en la práctica agrícola habitual, y otros tienen potencialidad para ser utilizados en el futuro (Naiman *et al.*, 2009). Ello indica la necesidad de continuar profundizando en los mecanismos de inoculación y en las ventajas que representan estos microorganismos en

la obtención de producciones más limpias y con un costo económico menor.

Se concluye que la aplicación de *A. lipoferum* influyó favorablemente en el establecimiento de *M. maximus* cv. guinea tobiatá, así como en el incremento del rendimiento acumulado de materia seca. Asimismo, el mayor rendimiento de MS se encontró en el testigo fertilizado, que difirió significativamente del resto de los tratamientos. La respuesta del rendimiento de masa seca a la inoculación respecto al control indica la posibilidad de emplear este biopreparado como alternativa a la fertilización mineral, y se recomienda probar dosis mayores en estudios posteriores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Piedras, J. J.; Xiqui-Vásquez. Ma., Luisa; García-García, Silvia & Baca, Beatriz E. Producción del ácido indol 3- acético en *Azospirillum brasilense*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50 (1-2):29-37, 2008.
- Aguirre-Medina, J. F.; Irizar-Garza, Martha B. G.; Durán-Prado, A.; Grageda-Cabrera, O. A.; Peñadel-Río, Ma de los A.; Loredó-Osti, Catarina *et al.* *Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México*. Chiapas, México: INIFAP. Folleto Técnico No. 5, 2010.
- Brasil, Marivaine da S.; Baldani, J. I. & Baldani, Vera L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*. 29 (2):179-190, 2005.
- Cárdenas, Diana. *Aislamiento y caracterización de cepas de Azospirillum sp. con potencial biofertilizante en pasto guinea (Panicum maximum Jacq.) del Valle del Cesar*. Tesis de Maestría, Biología Aplicada con énfasis en Biotecnología Agr. Colombia: Universidad Militar Nueva Granada, 2007.
- Cárdenas, Diana M.; Garrido, María F.; Bonilla, Ruth R. & Baldani, Vera L. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*. 33 (3):285-300, 2010.
- Cuesta-Muñoz, P. A.; Echeverría, H. M.; Santana, Martha O. & Barros Henriquez, J. Estrategia de manejo de praderas para mejorar la productividad de la ganadería en las regiones Caribe y Valles Interandinos. En: P. A. Cuesta-Muñoz, comp. y ed. *Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las regiones caribe y valles interandinos*. Bogotá: CORPOICA. p. 43-66, 2005. <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Foros/CAPITULOCUATRO.PDF>.24p. [10/03/2013].



- De-Bashan, Luz E.; Hernández, J. P.; Bashan, Y. & Maier, Raina M. *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* 69 (3):343-352, 2010.
- De-Bashan, Luz E.; Holguin, G.; Glick, B. R. & Bashan, Y. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón, eds. *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. México: Editorial Trillas. p. 170-224, 2007.
- Díaz-Franco, A. & Ortegón-Morales, M. A. Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización química en el crecimiento y rendimiento de canola (*Brassica napus*). *Rev. Fitotec. Mex.* 29 (1):63-67, 2006.
- Díaz-Zorita, M. & Fernández-Canigia, María V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 45 (1):3-11, 2009.
- Duncan, D. B. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 11 (1):1-42, 1955.
- Ferlini, H. Inoculación de semillas, una técnica también para gramíneas. *Producir XXI.* 16 (197):16-20, 2008.
- García-Olivares, J. G.; Mendoza-Herrera, A. & Mayek-Pérez, N. Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y Ciencia.* 28 (1):79-84, 2012.
- Hartmann, A. & Bashan, Y. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB). *Eur. J. Soil Biol.* 45 (special issue):1-2, 2009.
- Hernández, A.; Pérez, J. M.; Bosch, D. & Rivero, L. *Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba*. La Habana: AGRINFOR, 1999.
- Huerta, E.; Gómez, R. & Constantino, M. *Manual de aplicación y reproducción de biofertilizantes*. Villahermosa, Tabasco: ECOSUR, 2008.
- Naiman, A. D.; Latrónico, Alejandra E. & García de Salamone, Inés E. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and culturable rhizospheric microflora. *Eur. J. Soil Biol.* 45 (1):44-51, 2009.
- Oficina Nacional de Normalización. *Calidad del suelo. Análisis químico. Determinación del % de materia orgánica*. NC-51/99. La Habana: ONN, 1999a.
- Oficina Nacional de Normalización. *Calidad del suelo. Determinación de las formas móviles de potasio y fósforo*. NC-52. La Habana: ONN, 1999b.
- Oficina Nacional de Normalización. *Determinación de pH por el método electrométrico*. NC-10390. La Habana: ONN, 1999c.
- Ramírez-Eliás, M. A.; Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A.; Almaráz, J. J.; Ramírez-Valverde, G.; de-Bashan, Luz E. *et al.* Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential. *Appl. Soil Ecol.* 82 (1):1-10, 2014.
- Rivera-Botía, D. M. *Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en Azospirillum brasilense c16*. Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero de Producción Biotecnológica. San José de Cucuta, Colombia: Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander, 2008.
- Rueda-Puente, E. O.; Ortega-García, J.; Barrón-Hoyos, J. M.; López-Eliás, J.; Murillo-Amador, B.; Hernández-Montiel, L. G. *et al.* Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *INVURNUS.* 10 (1):10-17, 2015.
- Trejo, A.; De-Bashan, L. E.; Hartmann, A.; Hernández, J. P.; Rothballer, M.; Schmid, M. *et al.* Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environ. Exp. Bot.* 75 (1):65-73, 2012.

Recibido el 19 de diciembre de 2014

Aceptado el 1 de diciembre de 2015