

Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum* asociadas al cultivo del arroz.

Narovis Rives**, *Annia Hernández, *Mayra Heydrich***, *Julia Manzano*** y *Anar J. Rodríguez***.**

***Instituto de Investigaciones del Arroz.**

****Facultad de Biología. Universidad de la Habana.**

RESUMEN

La utilización de microorganismos en la agricultura constituye una alternativa promisorio al uso de químicos, los cuales al ser utilizados indiscriminadamente afectan al hombre, las plantas y los animales. Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) se encuentran entre los grupos más utilizados como inoculantes microbianos, debido a su efecto directo en la promoción del crecimiento de las plantas e indirecto sobre el medio ambiente de la rizosfera. En este sentido, los bioproductos confeccionados a base de cepas de *Azospirillum* han demostrado su efectividad sobre diferentes cultivos de interés agrícola, dado fundamentalmente por su capacidad de producir reguladores del crecimiento de las plantas y fijar nitrógeno atmosférico. Este trabajo tiene como objetivo aislar y caracterizar cepas del género *Azospirillum* asociadas al cultivo del arroz. Para el aislamiento se utilizó el Modelo Microcosmos y semillas de arroz variedad J-104. La identificación de los aislados se realizó mediante la combinación de métodos fenotípicos y serológicos, para lo cual fueron obtenidos previamente antisueros hiperinmunes anti-*Azospirillum*, utilizándose como antígenos fragmentos de pared celular purificados. Los resultados demostraron que *Azospirillum* es un género asociado al cultivo del arroz, lográndose aislar cepas de este género.

INTRODUCCIÓN

La rizosfera es considerada como la región donde los microorganismos crecen utilizando los compuestos derivados de la raíz como fuente carbonada, nitrogenada y energética, siendo sus componentes básicos las plantas, el suelo y los microorganismos (Lynch, 1990).

Entre los grupos microbianos que forman parte de la comunidad microbiana de la rizosfera están las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), las biocontrol-PGPB (Bashan y Holguín, 1998) y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) (Bonfante- Fassolo y Peroto, 1995), atribuyéndosele a los mismos beneficios tanto para las plantas como para los ecosistemas (Hernández *et al*, 2002).

Existen microorganismos que viven en el interior de células o tejidos de plantas superiores durante una parte considerable de su ciclo de vida, los que son denominados endófitos. En general los microorganismos endófitos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares, o en el tejido vascular. Existen alrededor de 500 000 variedades diferentes de plantas superiores, por lo que la diversidad de hongos y bacterias asociadas pueden estimarse en valores superiores, sugiriendo una extensa diversidad de endófitos y la posibilidad de usarlos en

agrobiotecnología. Especies de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Xantomonas* han sido aisladas frecuentemente de diversas plantas (Caballero Mellado et al., 2000).

El género *Azospirillum* fue descrito por vez primera por Tarrand *et al* (1978). El mismo comprende bacterias rizosféricas que se asocian a las raíces de las plantas en diferentes regiones del planeta, no tienen preferencia por plantas cultivadas o malas hierbas, plantas anuales o perennes, y pueden ser aplicados exitosamente en plantas en las que la bacteria no ha sido reportada anteriormente (Bashan y Holguín, 1997). Este amplio rango de hospedante constituye una ventaja obvia para cualquier bacteria beneficiosa, pudiendo ayudarla a sobrevivir mejor. Aunque son generalmente vistas como bacterias rizosféricas, algunas cepas de *Azospirillum* pueden también ser endófitas, pudiéndose encontrar dentro de las raíces de algunas gramíneas, incluyendo la caña de azúcar, por otra parte, Baldani *et al* (1997) encontraron algunas cepas de este género dentro de hojas y semillas de arroz.

Existen numerosas investigaciones que abordan los beneficios potenciales que *Azospirillum* puede conferirle a las plantas a las que se encuentre asociada y hay muchas evidencias de que los efectos hormonales, así como la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN), pueden ser los principales factores involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas (Vanderleyden et al., 2001).

Con relación al cultivo del arroz, Pazos (2000) y Velazco (2001) demostraron que entre los microorganismos presentes en la rizosfera se encontraba el género *Azospirillum* de forma predominante.

Este trabajo se realizó con el objetivo de caracterizar cepas del género *Azospirillum* asociadas al cultivo del arroz variedad J-104.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra y caracterización de algunos componentes de la fertilidad del suelo.

Para el desarrollo de este trabajo se tomaron muestras de suelo rizosférico procedentes de plantas de arroz variedad J-104. Para ello se realizaron muestreos de la rizosfera del cultivo en campos sembrados con plantas de aproximadamente 45 días de edad, en un área que nunca había sido biofertilizada. Para la recolección de cada muestra se tomaron cinco puntos por parcela según metodología descrita por Hernández (1996).

Estas muestras de suelo rizosférico fueron recolectadas en una de las áreas sembradas del Instituto de Investigaciones del Arroz. A las mismas se les determinó: pH- H₂O (método potenciométrico), materia orgánica (%) (WalkleyBlack), P (ppm) (Oniani), Ca²⁺ y Mg²⁺ intercambiables (cmol.kg⁻¹) (Maslova), según metodologías descritas por Paneque (2001).

Aislamiento

Para el aislamiento se utilizó el Modelo Microcosmos (Kabir *et al* 1995). Las semillas de arroz (*Oriza sativa*) variedad J-104 fueron desinfectadas en una solución de Hipoclorito de sodio al 25%. Posteriormente éstas se pusieron a pregerminar en cámaras húmedas y luego se colocaron en las columnas de suelo rizosférico procedentes de la localidad en estudio. Se colocaron en régimen de fotoperíodo 16 horas luz/ 8 horas oscuridad durante 12 días, manteniéndose las condiciones de humedad necesarias según lo descrito por Pazos y Hernández (1999).

Las plantas fueron cuidadosamente extraídas de las columnas y se separaron en raíz, tallo y hojas.

*Rizobacterias pertenecientes al género **Azospirillum**.*

Las raíces fueron maceradas en solución de PBS estéril. Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-7}) en esta misma solución y se sembraron por triplicado en frascos con Nfb semisólido y se incubaron a 35°C de 3 a 5 días, las cuantificaciones se realizaron por el método del número más probable (NMP), mediante la observación del crecimiento típico del microorganismo en medio NFb semisólido. En cada dilución los tubos positivos se anotaron y los datos fueron analizados empleando las tablas de Mc Crady (Postgate, 1969). De los frascos con crecimiento positivo o dudoso, se transfirieron alícuotas a medio NFb semisólido y a las 48 h se observaron al microscopio de contraste de fase para la confirmación de las características celulares. Para la obtención de cepas se seleccionaron los tubos con crecimiento positivo de las mayores diluciones. A partir de estos tubos se sembró por estrías en placas con medio Rojo Congo (Rodríguez, 1982).

*Endófitos del género **Azospirillum**.*

Las distintas partes vegetales fueron previamente desinfectadas con una solución de cloramina T (1%) durante 15 minutos y posteriormente con cada una de ellas se siguió la metodología descrita por Stoltzfus *et al.* en 1997.

Identificación de los aislamientos

La identificación de los aislamientos obtenidos fue realizada basándonos en el criterio de la capacidad de crecimiento del género *Azospirillum* en Rojo Congo que es un medio específico para su crecimiento ya que en el mismo las bacterias de este género son morfológicamente diferentes a los restantes géneros bacterianos fijadores de nitrógeno que pueden estar presentes en el medio enriquecido y formar parte de la comunidad que se desarrolla en el halo. Además los aislados fueron sometidos a algunas pruebas fisiológico-bioquímicas recomendadas en el Manual Bergey (1994).

Las colonias seleccionadas fueron purificadas posteriormente en placas de BMS (Dobereiner, 1980). La pureza de las cepas aisladas se confirma además mediante tinción de Gram, observándose la uniformidad celular al microscopio. Las cepas se rotularon siguiendo una numeración seriada y las colonias individuales fueron mantenidas en refrigeración a 4°C en cuñas de Agar BMS.

Se aplicó la técnica de aglutinación directa (Hernández *et al.*, 2002) para la identificación de los aislados. Para ello fueron utilizados antisueros hiperinmunes anti- *Azospirillum* *sp.* obtenidos mediante la inoculación de conejos grises de aproximadamente 2 kg de peso con fragmentos de pared celular de *Azospirillum brasilense* Sp7 por Hernández *et al.*, 1997.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunas características de la fertilidad del suelo estudiado

En la tabla 1 se muestran algunas características de la fertilidad del suelo estudiado, éste se caracteriza por poseer un contenido alto de materia orgánica, medio de calcio, bajo contenido de magnesio y un alto contenido de fósforo. Presenta además un pH alcalino.

Tabla 1. Algunas propiedades de la fertilidad del suelo estudiado.

Localidad	Ca²⁺ cmol/ kg	Mg²⁺ cmol/ kg	P (ppm)	Materia Orgánica	pH (H₂O)
Instituto de Investig. del Arroz	28.5	3.5	125.0	3.92	8.0

Poblaciones del género Azospirillum presentes en la rizosfera y en las distintas partes de la planta como endófitos.

En la tabla 2 se presentan las poblaciones microbianas presentes en la rizosfera y en raíz, tallo y hoja de la planta estudiada. Los resultados demostraron que las poblaciones microbianas presentes en la rizosfera son superiores a las encontradas en el interior de la planta, lo que coincide con resultados informados por otros autores que señalan que la diversidad y número de bacterias rizosféricas es muy elevada (Stoltzfus *et al.*, 1997; Hernández., 2001).

Se ha considerado que las bacterias endófitas podrían tener ventajas competitivas sobre las bacterias rizosféricas ya que la disponibilidad de nutrientes en el interior de la planta es mayor y el número de microorganismos endófitos es menor (Baldani *et al.*, 1997) lo que se corresponde con nuestros resultados.

Sin embargo, de modo general las poblaciones microbianas son altas, lo que podría explicarse, teniendo en cuenta las condiciones favorables que presenta el suelo para el crecimiento de los microorganismos. En este sentido, Berge *et al.* en 1991 señalaron la importancia de algunas propiedades de la fertilidad del suelo como el pH y la Materia Orgánica en la supervivencia y establecimiento de los microorganismos.

Tabla 2. Poblaciones microbianas presentes en las localizaciones estudiadas.

Localización	Microbiota Total (UFC.g ⁻¹)	Log UFC.g ⁻¹
Rizosfera	2,68 x 10 ⁹	9,43
Raíz	4,05 x 10 ⁶	6,61
Tallo	1,86 x 10 ⁸	8,27
Hoja	5,6 x 10 ⁸	8,75

Identificación de los aislamientos

Los aislados crecidos en medio Rojo Congo agar que fueron obtenidos a partir de un halo blanquesino a 4mm aproximadamente por debajo de la superficie en medio Nfb (medio libre de nitrógeno) y que presentaron además color rojo escarlata, consistencia seca, forma redonda o irregular con la superficie rugosa, así como respuesta negativa a la tinción de Gram, formas bacilares, pleomórficas, con ausencia de esporas y cápsulas y sin producción de pigmentos fluorescentes difusibles en el agar fueron incluidas dentro del género *Azospirillum*. Éstas presentaron además, motilidad abundante, respuesta positiva a la actividad oxidasa y ureasa y negativa al indol y a la hidrólisis de la gelatina. A las mismas se les aplicó la técnica de aglutinación directa, mostrando 18 de ellas respuesta positiva frente al antisuero anti- *Azospirillum* sp. utilizado.

Las poblaciones microbianas de este género obtenidas en las diferentes zonas de la planta (Tabla 3) demuestran que *Azospirillum* es un género bacteriano asociado al cultivo del arroz variedad J104. En este sentido, se ha demostrado que este género es común en la rizosfera de gramíneas, apareciendo asociado al cultivo del maíz (Hernández, 2001), trigo (Hernández *et al.*, 2002) y la caña de azúcar (Pérez, 2002).

Tabla 3. Poblaciones microbianas del género *Azospirillum* presentes en las localizaciones estudiadas.

Género	Rizosfera	Raíz	Tallo	Hoja
<i>Azospirillum</i>	1,1 x 10 ⁸	7,8 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁷

Generalmente las bacterias pertenecientes a este género han sido consideradas como rizobacterias, colonizando principalmente zonas de elongación y pelos radicales (Bashan *et al.*, 1996; Bashan y Holguín, 1998). Sin embargo en las últimas décadas se ha demostrado que cepas de *Azospirillum* pueden también aparecer endófitas pudiéndose encontrar dentro de las raíces de algunas gramíneas (Dobereiner *et al.*, 1995). Así mismo, Baldani *et al.* en 1997 encontraron este género dentro de hojas y semillas del cultivo del arroz.

Determinación de la frecuencia de aparición del género estudiado

En la tabla 4 se observan los valores en la frecuencia de aparición del género *Azospirillum* en las diferentes partes de la planta estudiadas.

Tabla 4. Frecuencia de aparición de *Azospirillum* en las localizaciones estudiadas con relación a la microbiota total.

Localización	Frecuencia de aparición (%)
Rizosfera	4,2
Raíz	19,2
Tallo	1,8
Hoja	6,1

Como se puede observar la mayor frecuencia de aparición de este género se presenta en raíz de forma endófito, lo que puede relacionarse con el hecho de que en el interior de la planta existe una menor competencia microbiana y una mayor disponibilidad de nutrientes.

De modo general los resultados demostraron que el género *Azospirillum* se encuentra asociado al cultivo del arroz existiendo una elevada especificidad planta-bacteria.

CONCLUSIONES

- Se aislaron e identificaron cepas pertenecientes al género *Azospirillum* en la rizosfera y en raíz, tallo y hojas del cultivo del arroz variedad J-104.
- El género *Azospirillum* presenta una alta frecuencia de aparición en el interior de las raíces de las plantas estudiadas.
- Los métodos de aislamiento empleados resultaron adecuados para la obtención de representantes típicos del género bacteriano en estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldani, J., Caruso, L., Baldani, V., Goi, S. Y Dobereiner, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legumes plants. Soil Biol. Biochem. 29:911-922.

Bashan, Y and G. Holguín (1997). *Azospirillum* plant - relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43: 103-121.

Bashan, Y. and G. Holguin (1998). Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classification: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30(8-9): 1225-1228.

Bashan, Y.; Holguín, G. y R. Ferrera Cerrato (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. Terra. 14(2): 159-192.

Berge, O, T. Heulin y J. Balandreau (1991). Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays*) growing on different french soil. Biol. Fertil. Soils. 11: 210-215.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(1994). 9na Edition. Editors N.R. Krieg and J. Holt. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. London.

Bonfante-Fassolo, P. and S. Perolto (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytology. 130: 3-12.

Caballero – Mellado, J., Von Scheven- Cordero, E., González-Cu, G. y Aguirre, J. (2000). Azospirillum inoculation and its agronomic application in Mejico. Fourth European Nitrogen Fixation Conference. Sevilla, Spain. P. 45.

Dobereiner, J. (1980). Forrage grasses and Grain Crops. In: Methods for evaluating Biological Fixation. Ed. By F. Bergensen: 535-555.

Dobereiner, J., Baldani,V. L. D., and Reis, V. M (1995). Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non leguminous crops. In : Azospirillum VI and related Microorganism, . Eds., pp. 3-14. Springer-Verlag, Berlín.

Hernández, A. (2001). Isolation and characterization the bacterial of maize rhizosphere Induced systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthinum* on bean and *Botrytis cinerea* on tomato. Reporte al Ministerio de Educación de Flandes. Universidad de Gent. Bélgica. 48p.

Hernández, A. N. (1996) Selección de rizobacterias para al biofertilización en el cultivo del maíz. Tesis. La Habana. CU.(Tesis en opción al Grado Científico de Maestro en Ciencias Biológicas). Facultad de Biología. Universidad de la Habana. 58p.

Hernández, A. N., García, D., Hernández, A. y M. Heydrich (1997). Determinación de algunos géneros bacterianos presentes en la rizosfera del cultivo del maíz. Cultivos Tropicales. 18(3): 10-14.

Hernández, A. Planas R, Martín G. y J. L. Santander (2002). Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) en suelo Ferráltico Rojo procedente de San José de las Lajas. Cultivos Tropicales. 23(1): 5-9.

Kabir, M., Faure, D., Heulin, T., Achoawk, W. and R. Bally (1995). Oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequences for the identification of four *Azospirillum* species. Can. J. Microbiol. 41: 1081-1087.

Lynch, J. M. (1990). The rhizosphere. Eds. Mc. Millands. London. 366p.

Paneque, V. M. (2000). Manual de Análisis de Laboratorio para suelo, foliar y aguas residuales. XIII Forum de Ciencia y Técnica. INCA. Documento Interno. 31p.

Pazos, M. (2000). Aislamiento e identificación de cepas nativas, pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. Tesis. La Habana. CU.(Tesis en opción al Grado Científico de Maestro en Ecología Microbiana). Facultad de Biología. Universidad de la Habana. 50p.

Pazos, M. y A. Hernández. (1999). Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum brasilense*, asociadas al cultivo del arroz. Cultivos Tropicales. 22(1): 6-8.

Pérez, P J.(2002). Aislamiento, caracterización y perspectivas de *Azospirillum* sp. (cepa 8-I) como inoculante en la caña de azúcar. Tesis. La Habana. Cu. (Tesis en opción al grado científico de Maestro en Ecología Microbiana) Facultad de Biología. UH. 62.

Postgate, J. (1969). Viable counts and viability. In: Methods in Microbiology. J R. Norris and D. W. Ribbons, eds. Academic Press. Vol. 1:611-628. New York.

Rodríguez Cáceres, E. A (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* sp. Appl. Environ Microbiol. 44(4): 990-991.

Stoltfuz J R, So R, Malavithi P P, Ladha JK and de Bruijn FJ. (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potencial for supplying rice with biologically fixed nitrogen.43-49.

Tarrand, J., Krieg, N. Y Dobereiner, J. (1978). A taxonomic study os *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov, and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp nov. Can. J. Microbiol., 24 : 967-980.

Vanderleyden, J., Dobbelaere, S., Sun, J., Vande Broock, A. y Van Domelen, A. (2001). Controlling elements in síntesis of indole- 3- acetic (IAA) and nitrogen metabolism in *Azospirillum brasilense*. 13th International Congress on Nitrogen Fixation. Abstract Book. Page 55.

Velazco, A. (2001). Utilización de *Azospirillum* brasilense en el cultivo del arróz (*Oriza sativa*) sobre un suelo Hidromórfico Gley de la provincia de Pinar del Rio. Tesis. La Habana. CU.(Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 128p.