

## Evaluación microbiológica preliminar de distintos tipos de MicoFert®\*

María Julia GARCÍA RAMÍREZ\*\* y Lisset HERNÁNDEZ SUÁREZ\*\*

**ABSTRACT.** Common soil microbiota including organisms involved in nutrient cycling such as phosphorus solubilizers and nitrogen-fixing bacteria (e.g., *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Frankia*, and *Azotobacter*) possess synergic relations with arbuscular mycorrhizae fungi ((AMF) and therefore may have a favorable influence on the mycorrhizic symbiosis by adding surplus nutrition compounds for plant growth. Due to current lack of phosphorus and nitrogen in soils, many species have developed alternative cycles (biologic nitrogen fixing) and/or systems which increase the assimilation capacity of both nutrients (mycorrhizae) through microorganism-plant symbiosis. These organisms can create ways for providing plants with the necessary phosphorus and nitrogen. The benefits of AMF fertilizers and bioprotectors in plant improvement is well known and results in many crops are encouraging and show countless advantages. The Institute of Ecology and Systematics, CITMA, Havana, Cuba (Instituto de Ecología y Sistemática (IES), Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medioambiente (CITMA), La Habana, Cuba) produces Certificate AMF under the trade mark MicoFert®, the resulting mycorrhizic substratum having a 90-100 % purity. Taking into account the importance of these inocula in current agriculture, preliminary studies on some groups (nitrogen-fixing bacteria and phosphorus solubilizers) and the total biota as well, associated with 8 types of Certificate MicoFert® (MFC) and a native soil (NAT) were carried out. Mycorrhizae and microbiologic analyses show that nitrogen-fixing bacteria and phosphorus solubilizers are found in significative numbers in all MFC under test. We conclude that AMF grow in close relation with microorganisms that aid in soil formation considering their capability in performing phosphorus solubilization and mineralization of organic and inorganic compounds. These microorganisms have a positive influence on plant growth when MFC inoculation practices are carried out.

**KEY WORDS.** Arbuscular mycorrhizae fungi, biofertilizers, microbiota, nitrogen-fixing bacteria, phosphorus solubilizers.

### INTRODUCCION

Existen varios tipos de micorrizas, pero el más extendido, formado por más del 90% de las especies vegetales, es el denominado vesículo-arbuscular (MVA), en virtud de las estructuras típicas que el hongo desarrolla en la corteza de la raíz, (Azcón-Aguilar, *et al.*, 1991). Esta dependencia es aún más marcada por parte de las MVA, debido que no se ha demostrado que sean capaces de completar su ciclo de vida en ausencia de la planta huésped y se les considera simbioses obligados, (Sieverding, 1991).

En la actualidad el proceso de producción de inóculos micorrizógenos en suelo, es el menos costoso y complicado y más ampliamente conocido. Esto es debido a que con el uso práctico de hongos micorrizógenos vesículo-arbusculares (MVA), en el manejo directo de la simbiosis por inoculación de las plantas con cepas seleccionadas de hongos provoca un aumento de forma artificial, pero controlada de hongos MVA presentes en la rizosfera de la planta y cambia localmente la composición de las MVA naturales, si existieran, (Sieverding y Barea, 1991).

Este tipo de inóculo biológico, es distribuido comercialmente en E.E. U.U. por Native Plants Incorp. (NPI), y otras instituciones; en Colombia por Minerales Exclusivos (MEX S. C. A); en Francia se denomina Endorize IV. En Cuba es distribuido por el Instituto de Ecología y Sistemática y su nombre comercial es MicoFert®, el cuál está formado por un substrato orgánico-mineral en el cuál se han reproducido vegetativamente los hongos micorrizógenos arbusculares seleccionados, asociados a las raicillas de una planta huésped.

Resulta una característica común de las plantas la presencia de poblaciones activas de microorganismos, entre las que se han reportado la presencia de bacterias nitrificadoras en las esporas de hongos del orden Glomales, (Paula *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1993 y 1994; Velazco *et al.*,

1992; Velazco *et al.*, 1999 y Velazco *et al.*, 2000 ) así como en el citoplasma de las micorrizas arbusculares (Perotto y Bonfante, 1997). Es por ello que se consideró la importancia de estos microorganismos en la estimulación que los hongos MVA experimentan cuando los mismos se encuentran en las proximidades de la raíz. Por la importancia que tienen estos inóculos, para su buen uso, manejo y aplicación en los diferentes cultivos de interés económico, se hace necesario realizar una evaluación microbiológica de los principales grupos funcionales de microorganismos que se encuentran asociados o presentes en los diferentes tipos de MicoFert® y que puedan influir en la relación hongo-planta-microorganismo es por lo que se consideró como objetivo fundamental evaluar microbiológicamente los diferentes tipos de MicoFert®, producidos por el Instituto de Ecología y Sistemática.

### MATERIALES Y METODOS

La experiencia se desarrolló en casa de vegetación y en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ecología y Sistemática (IES) perteneciente al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA).

Los inóculos de MicoFert® C (Certificado), objetos de estudio, fueron reproducidos por especialistas del Cepario Nacional de Hongos Micorrizógenos Arbusculares, radicado en el IES-CITMA, a partir de inóculos originales, con un 100% de pureza, multiplicado en *Sorghum bicolor* L Moench CV v-6 como planta huésped. Su reproducción se realizó en cajas plásticas con una capacidad de 55 dm<sup>3</sup>, el suelo utilizado es del tipo Ferralítico Amarillento Lixiviado (Hernández *et al.*, 1999) que se correlaciona en la clasificación internacional de FAO-UNESCO como -LIXISOL-, (Hernández *et al.*, 1996), con un pH de 5.6; el substrato empleado estaba compuesto por dicho suelo, turba y vermiculita en proporción de 1:1:1v/v, previamente esterilizado con bromuro de metilo,

\*Manuscrito aprobado en Septiembre del 2002.

\*\*Instituto de Ecología y Sistemática, A. P. 8029, C. P. 10800, La Habana, Cuba.

a excepción del suelo testigo; las plantas hospederas utilizadas fueron tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y maíz (*Zea mays* L.).

Se analizaron un total de ocho tipos de MicoFert® C los cuales estaban compuestos por la cepa IES reproducida, inóculo original, (Tabla 1), formada por propágulos colonizadores compuestos por raicillas colonizadas, micelio externo y esporas de hongos micorrizógenos arbusculares. A los inóculos de MicoFert® C obtenidos al término de los seis meses se les realizó las evaluaciones correspondientes a los índices de pureza del inóculo, % de colonización micorrízica, (Herrera *et al.*, 1984) a partir de raicillas teñidas por la técnica de Phillips y Hayman. Se determinó el número de esporas en 100 g de suelo, y se les efectuaron los análisis microbiológicos para evaluar la microbiota total y algunos de los principales grupos funcionales (bacterias nitrificadoras y solubilizadores de fósforo) presentes en los mismos.

La siembra bacteriológica se realizó por el método de las diluciones seriadas cuantitativas, desde la dilución 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-10</sup>, a partir de 1 g de suelo; para determinar la humedad las muestras fueron secadas hasta peso seco constante a 105°C, durante 1 hora. Para la evaluación de la microbiota total se empleó el Agar Nutriente (Oxoid- Agar No. 1), para los solubilizadores de fósforo (solubilizadores de P) se empleó el medio selectivo Ramos-Callao (Ramos y Callao, 1967), con pH de 6.5; y el medio de cultivo Fiodorov (Herrera, 1985), con un pH de 7.0 para nitrificadores (*Azotobacter*), la cuantificación en estos medios se realizó por el método del conteo de viables, dado en unidades funcionales de colonia por gramo de peso seco (ufc/gps).

El muestreo microbiológico de los tipos de MicoFert® se realizó de forma aleatorizada con tres réplicas por muestra y se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple y en aquellas variables donde hubo significación se les sometió a la prueba de comparación de medias, según el Test de Rangos Múltiples de Duncan.

Tabla 1. Nomenclatura de las cepas de hongos MVA seleccionadas para la obtención de MicoFert® C procedentes del Cepario Nacional - Instituto de Ecología y Sistemática

Tipos de MicoFert®	Nombre Científico	Procedencia
IES-1	<i>Glomus fasciculatum</i> (Thaxter) Gerdemann and Trappe emend Walker and Koske	Francia
IES-3	<i>G. spurgum</i>	Topes de Collantes (Cuba).
IES-4	<i>G. aggregatum</i> Schenk and Smith emend Koske	Topes de Collantes (Cuba).
IES-5	<i>G. mosseae</i> (Nicolson and Gerdemann) Gerdemann and Trappe.	Topes de Collantes (Cuba)
IES-8	<i>G. mosseae</i> (Nicolson and Gerdemann) Gerdemann and Trappe.	Estación Nacional de Frutales, Cuba
IES-16	<i>Scutellospora heterogama</i> (Nicol. And Gerd.) Walker and Sanders	Brasil.
IES-19	<i>Gigaspora rosea</i> Nicolson and Schenk	Brasil
IES-20	<i>Acaulospora mellea</i> Spain and Schenk	USA

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 se muestra el porcentaje de colonización micorrízica (IM) para cada tipo de MicoFert® C, (MFC)

analizado, en la que se observa que todos los inóculos incluyendo el nativo (NAT) presentaron valores por encima del 40%, con excepción de IES-20, lo que indica valores adecuados de colonización de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente en la producción de este tipo de inóculo (E. Furrázola, com. pers.).

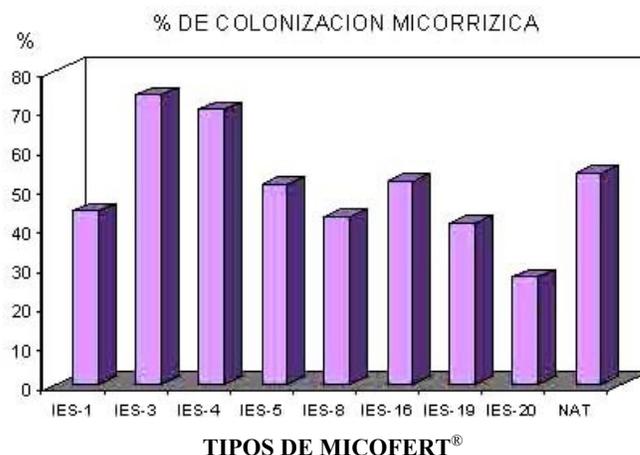


Fig. 1. Porcentaje de colonización micorrízica en diferentes tipos de MicoFert®, incluido el suelo nativo.

En el conteo de esporas realizado (Fig. 2), se observó que el suelo NAT presentó los mayores valores en comparación con los inóculos certificados, esto se debe a la presencia de esporas de diferentes especies de hongos MA nativas que se encuentran adaptadas a las condiciones inherentes al tipo de suelo y su estado nutricional, así como al tipo de planta huésped empleada (Sieverding, 1991).

Los resultados obtenidos en el conteo de la microbiota total, aparecen reflejados en la Tabla 2 donde los menores valores se encontraron en el inóculo micorrízico correspondiente a IES-8 con 1.763x10<sup>6</sup> ufc/gps y semejante al suelo NAT con valores de 1.935x10<sup>6</sup> ufc /gps; el mayor valor obtenido correspondió al tipo de MFC IES-4 con 2.547x10<sup>6</sup> ufc/gps., el resto de los inóculos presentaron valores desde 2.434 hasta 2.053 x10<sup>6</sup> ufc/gps con diferencias significativas entre algunos de ellos.

En el conteo de microorganismos solubilizadores de fósforo (Tabla 2), se observó la presencia de hongos solubilizadores en todos los inóculos analizados, con excepción de IES-16, en el cual no se apreció ningún tipo de microorganismo solubilizador, esto puede deberse en algunas ocasiones al pH del medio de cultivo, (Whitelaw, 2000) así como a la temperatura óptima de crecimiento de algunos de estos microorganismos en que puede variar las características y el tipo de microorganismo encontrado en la siembra bacteriológica (García y Cornide, 1988). En los valores obtenidos en los distintos inóculos se observaron diferencias significativas entre los IES-1, 8, 3 y 19 y de estos con el resto de los inóculos, sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre los IES-20, 4 y 5 y el suelo NAT.

En cuanto a las bacterias nitrificadoras, *Azotobacter*, (Tabla 2) los valores encontrados en los diferentes tipos de MFC reflejaron diferencias significativas entre todos, con excepción del IES-19 en el cual no se observó la presencia

de este grupo. Por lo que se puede inferir que la actividad de los fijadores de nitrógeno de vida libre disminuye, debido a los exudados radicales presentes o producto del metabolismo de esta cepa de MVA (*Gigaspora rosea*) que pudiera provocar la inhibición de las poblaciones de este género de microorganismo.

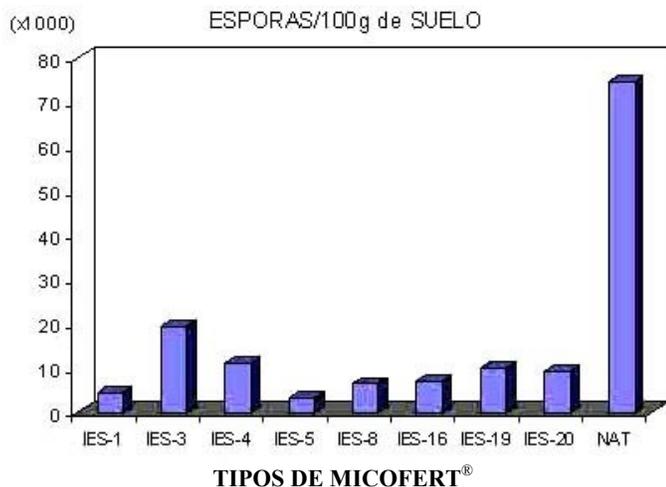


Fig. 2. Conteo de esporas presentes en diferentes tipos de MicoFert®, incluido el suelo nativo.

Tabla 2. Población microbiana en los diferentes tipos de MicoFert®, incluido el suelo nativo dado en ufc/gps.

Tipos de MicoFert®	Microbiota total (x10 <sup>6</sup> )	Solubilizadores de P (x10 <sup>4</sup> )	Nitro fijadores (x10 <sup>2</sup> )
IES-1	2.088 d*	24.0 a	4.0 e
IES-3	2.311 c	10.0 c	8.98 c
IES-4	2.547 a	1.16 e	11.4 a
IES-5	2.434 b	0.4 e	9.9 b
IES-8	1.763 e	20.0 b	1.8 g
IES-16	2.132 d	DN**	7.2 d
IES-19	2.321 c	7.0 d	DN**
IES-20	2.053 d	3.0 e	4.1 e
Suelo Nativo	1.935 e	2.0 e	2.8 f
E S	0.083	3.19	1.268

Medias con letras diferentes, en la misma columna, difieren significativamente ( $P \leq 0.05$ ) mediante la prueba de Duncan.

\*\* DN: datos no disponibles.

En el tipo de MFC formado por la cepa IES-4 (*G. aggregatum*), presentó altos valores de porcentaje de colonización micorrízica, microbiota total y microorganismos nitro fijadores, sin embargo en el conteo de solubilizadores los resultados obtenidos están por debajo de la mayoría de los inóculos analizados, con excepción de IES-5 que resultaron inferiores. Con estos resultados se infiere que la presencia de microorganismos de vida libre en la rizosfera, producen un efecto sinérgico con los hongos MVA y que estos microorganismos pueden aumentar o disminuir en dependencia de que el efecto entre ellos sea sinérgico o antagónico; Sieverding, (1991), obtuvo resultados similares a los nuestros.

La presencia de microorganismos del suelo pertenecientes a grupos funcionales que resultan beneficiosos para el desarrollo y crecimiento de las plantas, en los diferentes inóculos de

MicoFert®, potencian la calidad del biofertilizante, con vistas a su aplicación en la práctica agrícola y forestal. Azcón, (1989), demostró que las bacterias rizosféricas incrementan la permeabilidad de la pared celular lo que conlleva a una mayor susceptibilidad de las plantas a la colonización micorrízica.

Resultados obtenidos por Perotto y Bofante, (1997) señalaron la presencia de formas bacterianas en el citoplasma de algunos representantes de tres familias de *Glomales*; *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae* y *Glomaceae*, por lo que se confirma la importancia que adquiere la microbiota asociada en este tipo de inóculo biológico.

## CONCLUSIONES

- ◆ En el tipo de MicoFert® Certificado IES-3, *Glomus spurcum*, se obtuvieron los valores más elevados de porcentaje de colonización micorrízica y conteo de esporas además de presentar valores significativos en la microbiota total, solubilizadores de fósforo y nitro fijadores de vida libre.
- ◆ La presencia de microorganismos solubilizadores de fósforo se observó significativamente en tres de los inóculos evaluados IES-1, 3 y 8 (*Glomus fasciculatum*, *G. spurcum* y *G. mosseae*) sin embargo no se detectó la presencia de este microorganismo en el IES-16, *Scutellospora heterogama*.
- ◆ En todos los inóculos analizados se encontraron presentes las bacterias del género *Azotobacter*, con excepción del IES-19, *Gigaspora rosea*.
- ◆ La valoración microbiológica preliminar realizada en los diferentes tipos de MicoFert® demuestra la presencia de microorganismos del suelo, capaces de crecer adecuadamente, en un substrato simple, sin muchos requerimientos nutricionales, por lo que constituye un reto científico actual la exploración de la actividad beneficiosa microbiana de la rizosfera, y así lograr la obtención, selección y manejo de un inoculante micorrizógeno en el cuál se encuentren presentes los diferentes grupos funcionales, capaces de aportar a las plantas los nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo en los ecosistemas agrícolas y forestales.

## REFERENCIAS

- Azcón, R. 1989. Selective interactions between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochemic.* 21, 639.
- Azcón-Aguilar, C., F. García-García, y J. M. Barea 1991. Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesiculo-arbusculares. En *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Vol. II. *Fijación de N y micorrizas*. (J. Olivares y J. M. Barea, eds.). CSIC, Madrid, pp. 129-147.
- García, M. J. y R. I. Cornide, 1988 Evaluación "in vitro" de bacterias solubilizadoras de fósforo tricálcico, a diferentes temperaturas. I Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Micorrizólogos, Instituto de Ecología y Sistemática. Ciudad de La Habana.
- Hernández A., J. M. Pérez, R. Marsán., M. Morales y R.

- López 1996. Correlación de la nueva versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba, con Clasificaciones Internacionales (Soil Taxonomy y FAO-UNESCO) y clasificaciones nacionales (2da. Clasificación genética y clasificación de series de suelos). Instituto de Suelos, Ministerio de la Agricultura, La Habana, 35.
- Hernández A., J. M. Pérez, D. B. Infante, L. R. Ramos, E. C. Díaz *et al*. 1999: Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. MINAGRI. La Habana, Cuba, 64 pp.
- Herrera, G. A. L. 1985. *Manual de Medios de Cultivos*. Editorial Científico-Técnica Ciudad de La Habana.
- Herrera, R. A., R. L. Ferrer y L. Z. Prikril. 1984. Determinación colorimétrica de la densidad de infección en micorrizas VA por extracción de azul de Tripán. I. Descripción del método. *Acta Botánica Cubana*. ACC. 20, 148.
- Paula, M. A., Reis V. M. y J. Döbereiner 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugar cane (*Sacharum spp*) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol. Fert. Soils*. II, 111.
- Paula, M. A., J. O. Siqueira y J. Döbereiner. 1993. Ocorrência de fungos micorrizicos vesiculo-arbusculares e de bacterias diazotroficas na cultura de Batata-Doca. *Rev. Brasil. Ci. Solo*. 17, 349.
- Paula, M. A., J. O. Siqueira. y J. Döbereiner. 1994. Crecimiento micelial de fungos micorrizicos vesiculo-arbusculares V. A. Presencia de celulas vegetais de bacterias diazotroficas "in vitro". *Rev. Brasil. Biol.* 54(4), 631.
- Perotto, S. y P. Bonfante. 1997. Bacterial associations with mycorrhizal fungi. Close and distant friends in the rhizosphere. *Trends. Microbiol.* 5(12), 496.
- Phillips, J. M. y Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Trans. British Mycol. Soc.* 55, 158p.
- Ramos A. y V. Callao. 1967 El empleo de la solubilización de fosfatos en placas, como técnica diferencial bacteriana. *Microbiología*, 20 (1), 10.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza management in tropical ecosystems. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*. Germany, 367p.
- Sieverding, E. y J. M. Barea. 1991. Perspectivas de la inoculación de sistemas de producción vegetal con hongos formadores de micorrizas VA. Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. CSIC, Madrid, España, 2, 221.
- Velazco, A., F. Fernández, E. Furrázola y R. A. Herrera 1992. Presencia de *Acetobacter diazotrophicus* en esporas de la familia Endogonaceas. *Cultivos Tropicales*. 13(1), 25.
- Velazco, A., L. C. Hernández, M. J. García. y R. A. Herrera. 1999. Existencia de diazotófos en esporas de *Glomus clarum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41 (2), 83.
- Velazco, A., M. Medina, E. Furrázola y R. A. Herrera-Peraza. 2000. Caracterización de las comunidades de bacterias diazotróficas asociadas a esporas de hongos micorrizógenos VA. Anales Científicos XX RELAR. Arequipa, Perú. Cap.II. 66.
- Whitelaw, M.A., 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. Academic Press. (69) 99.