

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO *Azospirillum* AISLADAS DE DOS TIPOS DE SUELOS DE LA LOCALIDAD DE SAN NICOLÁS DE BARI

Mabel Pazos, Annia Hernández, M. Paneque y J. L. Santander

ABSTRACT. A total of 40 bacterial strains were isolated by means of Microcosms model, starting from two types of soils of San Nicolás de Bari town, Havana. Twelve of these strains were identified as belonging to *Azospirillum* genus by combining traditional and serological methods of agglutination in slides and double immunodiffusion. Strains were characterized according to acetylene-reducing capacity and indol acetic acid (IAA) production. The twelve strains showed acetylene-reducing capacity; however, just five of them presented a consistent and important acetylene-reducing capacity (41.66 %). Also, IAA production was proved.

Key words: *Azospirillum*, indol acetic acid, acetylene, reduction

RESUMEN. Un total de 40 cepas bacterianas fueron aisladas empleando el modelo Microcosmos, a partir de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari, La Habana, siendo doce de estas identificadas como pertenecientes al género *Azospirillum*, por combinación de métodos tradicionales y serológicos de aglutinación en portaobjetos e inmunodifusión doble. Se realizó la caracterización de las cepas en cuanto a capacidad de reducción del acetileno y producción de ácido indol acético (AIA). Las doce cepas mostraron actividad reductora del acetileno; sin embargo, solo cinco de estas cepas presentaron una capacidad para reducir el acetileno de forma consistente e importante (41.66 %). Igualmente se comprobó que producen AIA.

Palabras clave: *Azospirillum*, ácido indol acético, acetileno, reducción

INTRODUCCIÓN

Por más de 100 años, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas ha sido considerada como la forma más eficiente de transformación del N₂ atmosférico en nitrógeno aprovechable para las plantas; sin embargo, durante las dos últimas décadas, el estudio de la fijación biológica del nitrógeno por bacterias asociativas o de vida libre cobra cada vez mayor atención por parte de los investigadores, en su afán de encontrar alternativas a la creciente demanda de fertilizantes minerales que como es bien conocido afecta la vida, tanto de los seres humanos como de las propias plantas y animales, provocando un desequilibrio ecológico que amenaza con ser irreversible. Unido a esto, los microorganismos rizosféricos juegan un importante papel en la agricultura, ya que poseen la capacidad de descomponer y reciclar elementos que son inutilizables en su estado natural e incluso, establecer entre sí relaciones que pueden conducir a la protección contra patógenos (1).

Es por ello, que actualmente se dedica particular atención al estudio y esclarecimiento de las interacciones plantas-microorganismos rizosféricos, trabajo que ha sido desarrollado de forma gradual y ascendente, comprobándose que estos microorganismos son capaces de influir positivamente sobre la germinación de la semilla y el desarrollo posterior de las raíces (2).

Entre los microorganismos de vida libre que se emplean para la biofertilización se encuentra el género *Azospirillum*, el cual ha sido objeto de estudio desde la década del setenta, por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y estimular el crecimiento vegetal, permitiendo de esta forma el desarrollo más saludable y económico de las plantas. Por tales motivos, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar cepas de este género y caracterizarlas, en cuanto a su capacidad de fijar nitrógeno y producir ácido indol acético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de dos suelos de la Asociación Campesina "José Luís García", en el municipio de San Nicolás de Bari, La Habana: el primero Ferralítico Rojo compactado y el segundo Ferralítico Amarillento (3). Se determinaron algunas de sus propiedades físicas y químicas, las que se muestran en las Tablas I y II.

Mabel Pazos, Investigadora (mpazos@inca.edu.cu), Ms.C. Annia Hernández, Investigador Agregado, Dr.C. M. Paneque, Investigador Titular y J. L. Santander, Reserva Científica del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Tabla I. Propiedades físicas de los suelos

Suelo	Arena gruesa	Arena fina	Limo grueso	Limo fino	Arcilla	Coefficiente de dispersión
FRC						
T	8.56	8.00	4.00	4.00	75.44	25.77
M	68.56	6.00	5.00	1.00	19.44	
FA						
T	6.56	8.00	4.00	2.00	77.44	17.36
M	76.56	6.00	2.00	2.00	13.44	

FRC: Ferralítico Rojo compactado M: Microestructura
 FA: Ferralítico Amarillento T: Textura

Tabla II. Propiedades químicas de los suelos

Suelos	Meq/100			P (ppm)	MO (%)	pH	
	K	Ca	Mg			H ₂ O	KCl
FRC	0.20	22.5	6.0	19	2-14	6.0	4.8
FA	0.23	27.5	5.0	15	2.11	5.9	4.9

Para el aislamiento de las cepas nativas del género *Azospirillum* se emplearon dos variedades de arroz: J 4024 y Amistad 82, utilizando el modelo Microcosmos (4), las que se colocaron en régimen de fotoperíodo durante 12 días, manteniéndose las condiciones de humedad necesarias.

Pasado este tiempo, se lavaron las raíces y se maceraron en morteros estériles, realizando diluciones seriadas hasta 10⁻⁸. De cada dilución se inocularon tres tubos de medio Nfb semisólido (5) y se incubaron por siete días a 37°C. Con posterioridad, los tubos que presentaron el halo característico del género *Azospirillum* se transfirieron a placas que contenían medio Rojo-Congo-Agar (6) y se incubaron a 37°C durante 72 h.

Se tomaron las colonias típicas y se sembraron en medio Agar Nutriente (7), para realizar su identificación por combinación de métodos tradicionales y serológicos. Se emplearon algunas pruebas micromorfológicas y bioquímicas, según el Manual de Sistemática de Bergey (8). Las características culturales se determinaron empleando el medio Rojo-Congo-Agar (6), como se indica en la Tabla III. Estas pruebas se realizaron también a las cepas patrones y de referencia empleadas en este estudio.

Tabla III. Cepas utilizadas para cada especie

Cepas	Procedencia	Hospedero
	<i>Azospirillum lipoferum</i>	
4B	Bally <i>et al.</i> , 1983	Arroz
4T	Bally <i>et al.</i> , 1983	Arroz
	<i>Azospirillum brasilense</i>	
Sp 7	LMG1263	Digitaria
	<i>Azospirillum irakense</i>	
KaC ₅	Khammas <i>et al.</i> , 1989	Arroz
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	
0057		Maíz

A todas las cepas se les realizó la prueba serológica de aglutinación directa e inmunodifusión doble (IDD). La aglutinación directa se realizó enfrentando 20 µL del antígeno con 20 µL del antisuero sobre una lámina de portaobjetos. La IDD se realizó (9) utilizando como control positivo las cepas de referencia y como control negativo la cepa *Pseudomonas cepacia* 0057.

Los antígenos se obtuvieron mediante la propagación de las cepas aisladas y tipos en medio caldo nutriente durante 24 h a 37°C. Posteriormente, las células fueron recogidas y lavadas en PBS mediante centrifugaciones sucesivas a 10 000 rpm durante 15 minutos. Por último se resuspendieron con esta misma solución. Con el antisuero empleado (10) se inmunizaron conejos albinos de aproximadamente 2 kg.

Para la caracterización se seleccionaron 12 de las cepas aisladas e identificadas como pertenecientes al género *Azospirillum* sp. Se caracterizaron las cepas en cuanto a su actividad fijadora de nitrógeno y se empleó el método indirecto de la actividad reductora del acetileno (ARA) en cromatógrafo gaseoso (11). Las cepas fueron inoculadas en 2 mL del medio semisólido contenidos en viales de 5 mL de capacidad con tapones de algodón y se incubaron a 37°C durante 24h. Se siguió un diseño completamente aleatorizado con tres observaciones para cada cepa. Una vez pasado este tiempo, los tapones se cambiaron por tapones de goma y se cerró herméticamente cada vial; se extrajo 1 mL de aire y se inyectó 1 mL de acetileno, se incubó durante una hora a temperatura ambiente y se inyectó en el cromatógrafo 1 mL del gas de cada vial. Se registró el pico de etileno producido en cada caso. Los nmoles.h⁻¹.mL⁻¹ de etileno (ARA) se determinaron midiendo el área de los picos.

Posteriormente, se realizó la caracterización en cuanto a producción de ácido indol acético (AIA) (12). Las mediciones se realizaron espectrofotométricamente, se empleó un blanco formado con 20 µL de metanol. Previamente se realizó una curva patrón de AIA en un rango entre 20 y 100 µg.mL⁻¹. Se siguió un diseño completamente aleatorizado con tres observaciones para cada cepa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis físicos y químicos realizados a los suelos corroboran su clasificación; se observó en los aislamientos de ambos una estructura de la comunidad microbiana muy similar, con predominio de bacterias nitrofixadoras pertenecientes a *Azospirillum*. Por otra parte, en estudios microbiológicos de un suelo Ferralítico Rojo compactado se encontró igual predominio de bacterias fijadoras de nitrógeno de este género; esto pudiera deberse en primer lugar a la capacidad de estas bacterias de adherirse a las partículas de arcilla y crecer a pH ácidos (13).

Mediante el modelo Microcosmos, se aislaron un total de cuarenta cepas bacterianas; de ellas, doce fueron identificadas posteriormente, por combinación de métodos tradicionales y serológicos, como pertenecientes al género *Azospirillum* (14). En la Tabla IV se reflejan las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas.

Tabla VI. Pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas a las cepas

Cepas	Pruebas fisiológicas y bioquímicas		
	Catalasa	Hidrólisis del almidón	Hidrólisis de la gelatina
1	+	-	-
2	+	-	-
3	-	-	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	++	-	-
7	+	-	-
8	++	-	-
9	+	-	-
10	+	-	-
11	+	-	-
12	+	-	-
Sp 7	+	-	-
0057	+	-	-

Como se observa en la tabla, ninguna de las cepas hidrolizaron ni el almidón ni la gelatina, lo cual es propio del género *Azospirillum*, coincidiendo con lo citado por el manual de Bergey (8). La mayoría de las cepas resultaron catalasa positiva, que es lo más común en este género. La cepa número 3 resultó negativa; sin embargo, esta coincide en sus otras características con la cepa tipo de *A. brasilense* e incluso crece en ausencia de biotina, factor que limita el crecimiento para *A. lipoferum*. Otros autores obtuvieron resultados similares al identificar cepas nativas pertenecientes al género *Azospirillum* (13, 15).

Los métodos serológicos corroboraron los resultados obtenidos por los métodos tradicionales. Todas las cepas respondieron a la aglutinación en portaobjeto de forma positiva, aunque existieron diferencias en cuanto a la intensidad de la reacción. Esto pudiera deberse a que aún siendo de la misma especie, tengan determinantes antigénicos diferentes. No obstante, se logra una alta discriminación para este género bacteriano con respecto a otros que habitan también la rizosfera de cultivos de interés económico, como es el caso del control negativo empleado (*P. cepacia* 0057).

En estudios de diagnóstico microbiológico de *Acetobacter diazotrophicus*, se empleó la aglutinación directa y se corroboró la gran aplicabilidad que tiene por su sensibilidad y sencillez (16). Igualmente se utilizó esta técnica con un 100 % de efectividad para la identificación de cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera del cultivo del maíz (17).

La Figura 1 muestra los resultados de la inmunodifusión doble (IDD), observándose los arcos de precipitación formados entre los antígenos de las cepas aisladas de *Azospirillum* y de referencia y el antisuero anti-*Azospirillum* Sp 7. En el caso de la cepa 3, se corrobora por esta técnica su ubicación taxonómica dentro de *A. brasilense*.

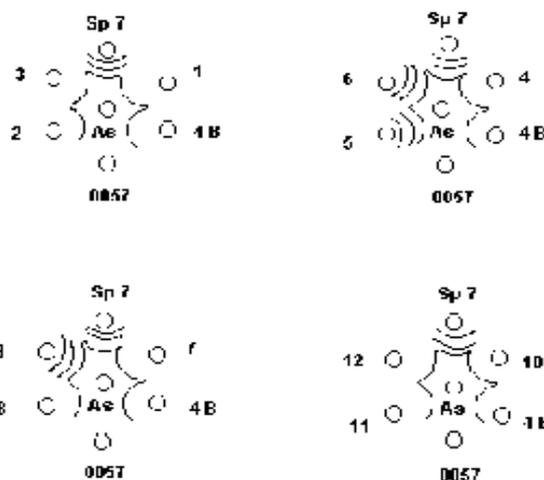


Figura 1. Áreas de precipitación formadas en la IDD. En el pocillo central se colocó el antisuero anti-*Azospirillum* y alrededor los antígenos de las diferentes cepas en estudio y de las cepas tipo

En todos los casos se observó el determinante genérico, lo que permitió identificarlas dentro de *Azospirillum*; las cepas 5, 6 y 9 presentaron dos arcos de precipitación, lo que indica una mayor proximidad antigénica a la cepa *A. brasilense* Sp 7 empleada para la obtención del antisuero. Algunos autores emplearon la IDD para la identificación de este género con iguales resultados (10, 15).

En este trabajo, todas las cepas presentaron actividad reductora del acetileno (ARA), según muestra la Figura 2; sin embargo, solo cinco de estas cepas (41.66 %) presentaron una capacidad para reducir el acetileno, de forma consistente e importante.

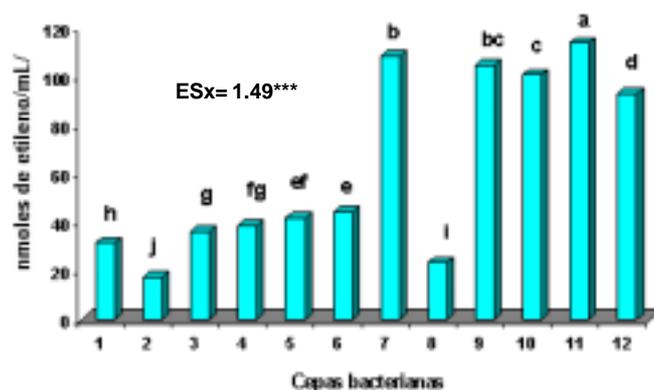


Figura 2. Actividad reductora del acetileno de las cepas de *Azospirillum*

Los valores de ARA oscilaron entre 17-114 nmoles de $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$ y las cepas que manifestaron mayor reducción fueron la 7, 9, 10, 11 y 12 con valores mayores de 100, diferenciándose significativamente el valor de la cepa 11 con el de las restantes cepas en estudio. Estos valores son superiores a los hallados previamente (18).

Otros estudios de laboratorio muestran que particularmente las cepas de *Azospirillum* son más efectivas que otros grupos microbianos en la reducción del acetileno. Así se realizaron mediciones utilizando esta técnica a diferentes diazotrofos encontrados en los cultivos del arroz y caña de azúcar (19) y se encontró que *Azospirillum* fue de todos los presentes al que le correspondieron los mayores valores de ARA. Por otra parte, al inocular plantas de maíz con bacterias del género *Azospirillum*, se observó un incremento en los rendimientos que fue atribuido entre otros factores a la capacidad de fijar nitrógeno de estas bacterias (20).

La caracterización de cepas de rizobacterias en cuanto a producción de hormonas es un parámetro importante, no sólo por los efectos fisiológicos que estas causan en las plantas sino también con vistas a esclarecer su posible papel en la interacción planta-bacteria. Las 12 cepas analizadas produjeron ácido indol acético en proporciones bajas pero suficientes para la acción de esta hormona, pues es conocido que el AIA actúa a bajas concentraciones sobre el metabolismo de la planta. La cepa más productora fue la 3 con 33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y el resto osciló entre 10 y 12.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, como muestra la Figura 3, existiendo diferencias significativas entre la cepa 3 con respecto a las restantes. Resultados similares se han obtenido en la producción de AIA en este género (21, 22).

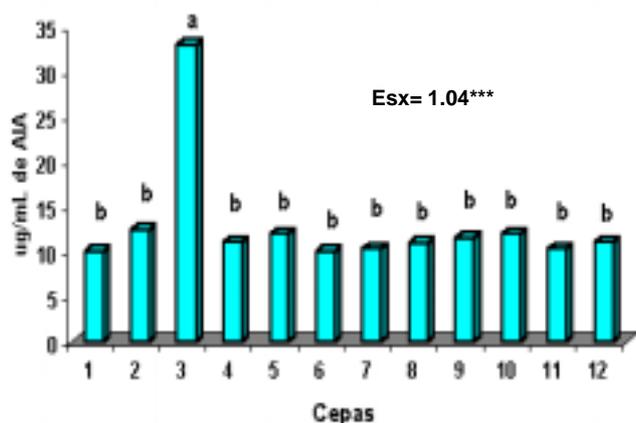


Figura 3. Producción de ácido indol acético por las cepas de *Azospirillum*

Estos resultados unidos a los de la actividad reductora del acetileno corroboran lo ya planteado acerca de la posibilidad de que más de un mecanismo de acción esté involucrado en la asociación planta-microorganismo y que puedan operar de forma simultánea o en sucesión.

REFERENCIAS

- De Melo, I. S. y Valarini, P. J. Potencial de rizobacterias no control de *Fusarium solani* (Mart) Sacc. Em Pepino (*Cucumis sativum* L.). *Sci. Agric.*, Piracicaba, 1995, vol. 52, no. 2, p. 326-330.

- Hernández, A. N., Hernández, A. y Heydrich, M. Selección de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz. *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 3, p. 5-8.
- Hernández, A., et al. Nueva versión de clasificación de los suelos de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba. Suelos. La Habana. 1995.
- Kabir, M. y Faure, D. Identificación of *Azospirillum* by oligonucleotide probes after isolation from soil and Sorghum rizoplan contaminated or not by the parasitic plant: *Striga*. *Advances in Applied Microbiology*, 1995, vol. 35, p. 195-253.
- Day, J. H. y Döbereiner, J. Physiological aspects of N_2 -fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil. Biol. Biochem*, 1976, vol. 8, p. 45-50.
- Rodríguez-Cáceres, E. A. Improved medium for isolation of *Azospirillum* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, vol. 44, no. 4, p. 990-991.
- Harrigan, W. F. y Mc Cance, M. E. Métodos de laboratorio en microbiología. Editorial Academia León, 1968, 426 p.
- Krieg, N. y Döbereiner, J. Genus *Azospirillum*. En *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*. Baltimore : Williams and Wikinson, 1984, p. 94-103.
- Ouchterlony, O. y Nilsson, D. A Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En Weir D. M. (ed). *Handbook of experimental immunology*. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1978, p. 655-706.
- Hernández, A., Hernández, A. N. y Calzadilla, M. Identificación de cepas de *Azospirillum* sp aisladas de la rizosfera del maíz. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 2, p. 5-7.
- Hardy, R. N. F., Burns, R. C. y Dodd Holsten, R. Applications of the acetylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Biochem*, 1973, vol. 5, p. 47-81.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H. y Hubell, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of plant millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, vol. 37, p. 1016-1024.
- Hernández, A. N. Selección de rizobacterias para la biofertilización en el cultivo del maíz. [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas]. Universidad de La Habana, 1996.
- Pazos, M. y Hernández, A. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. provenientes de la rizosfera del arroz (*Oryza sativa*). *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 17-19.
- Fernández, A. I. *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*, sus relaciones con maíz y caña de azúcar. [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas]. Universidad de La Habana, 1995.
- Rojas, M. Empleo de métodos serológicos, taxonómicos y de conservación en el estudio de la especie *Acetobacter diazotrophicus*. [Trabajo de Diploma]. Universidad de La Habana. 1995.
- Hernández, A., Fernández, A. I. y Hernández, A. N. Identificación de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 1, p. 14-16.
- Khammas, K. M., et al. The nitrogen-fixing bacteria from iraqi rice-field soils. *Eur.J.Soil*, 1994, vol. 30, no. 3, p. 101-106.

19. Velazco, A. C. *Azospirillum* sp como diazótrofo predominante en los cultivos de caña de azúcar y arroz. [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas]. Universidad de La Habana, 1997.
20. Purcino, A. A. C., *et al.* Influence of the inoculation with *Azospirillum* sp. in nitrogen and carbon fixation on yield seed and assimilation nitrogen enzymes in maize. *Journal of Plant Nutrition*, 1996, vol. 19, no. 7, p. 1045-1060.
21. Hernandez, M. Síntesis de ácido-3-indol acético a partir de fuente microbiana. [Trabajo de Diploma]. Universidad de La Habana. 1994.
22. Santander, J. L., *et al.* Caracterización de cepas bacterianas en cuanto a la producción de ácido indol acético. En XI Seminario Científico del INCA. La Habana, 1998.
23. Rivera, A. Evaluación de la relación *Azospirillum*-planta en diferentes condiciones de ensayo. [Tesis de Diploma]. Universidad de La Habana, 1990.

Recibido: 19 de noviembre de 1999

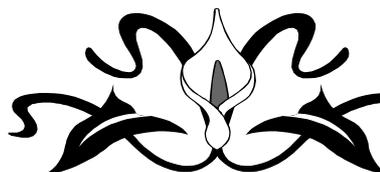
Aceptado: 22 de diciembre de 1999

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

MAESTRÍA

"Mejoramiento Genético de las plantas"

Duración: 2 años
 Fecha de comienzo: septiembre
 Precio: 5 000 USD
 Coordinador: Dra.C. Marta Alvarez



Para más información diríjase a:

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
 Dirección de Educación y Relaciones Públicas
 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
 Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
 La Habana, Cuba CP 32700
 Telf: (53)(64) 6-3867, 6-3773
 Fax: (53)(64) 6-3867
 e-mail: posgrado@inca.edu.cu