

SELECCIÓN DE CEPAS BIOESTIMULADORAS DE *Azotobacter sp* Y *Azospirillum sp* PARA EL CULTIVO DEL ARROZ.

Janet Rodríguez Sánchez, Rosa García Gómez, Rafael Martínez Viera, Grisel Tejada González y María Elena Simanca Morales.

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.**

RESUMEN

El cultivo del arroz es uno de los más difundidos en el mundo ya que constituye una parte importante de la seguridad alimentaria en muchos países. En Cuba su cultivo se ha extendido en los últimos años en distintas condiciones, como parte del sub-programa de arroz popular de la Agricultura Urbana, ampliándose el rango de tipos de suelos, condiciones de humedad y modos de fertilización para su siembra. El presente trabajo tiene como objetivo seleccionar cepas eficientes de los microorganismos fijadores de nitrógeno *Azotobacter sp.* y *Azospirillum sp.* sobre el crecimiento y estimulación en plántulas de arroz y evaluar este efecto al aplicar un biofertilizante resultado del cocultivo de ambas bacterias. El estudio se llevó a cabo mediante el método de screening utilizando 13 cepas de *Azotobacter chroococcum* y 5 de *Azospirillum*, procedentes de distintas regiones de Cuba, México y Colombia. La actividad estimuladora se evaluó mediante pruebas de inoculación en bandejas con suelo Pardo con Carbonato, utilizando el cultivo de arroz, variedad Perla de Cuba. La dosis de aplicación fue de 0.2 mL/ semilla. Las plantas fueron evaluadas 30 días después de la germinación midiendo los componentes del crecimiento para esta etapa. Los datos fueron procesados por análisis de varianza múltiple y pruebas de Rango múltiple de Duncan utilizando el paquete estadístico STATGRAPH. Las cepas seleccionadas fueron la CoA-1 de *Azotobacter chroococcum* y las P-8 y Azpcub2 de *Azospirillum sp.* El cocultivo fermentado a partir de las cepas CoA-1 de *Azotobacter chroococcum* y P-8 de *Azospirillum sp.* incrementó los parámetros evaluados.

ABSTRACT

The culture of rice to constitute one important part of the alimentary safety in many countries. In Cuba to extend its culture, as part of the peoples rice in the Urban Agriculture Sub-program, extenment of range of soil type, humidity conditions and fertilization mode for its sowing. This work has the objective, of select efficient strain of the nitrogen-fixing microorganisms *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum sp* above growing component in rice plants, select best formula of culture medium to ferment *Azospirillum sp*, to evaluate the effect of biofertilizer result of Coculture both bacterias and choose the best moisture for the application of bioprepared. The stimulate activity was evaluated through biotest method using brown with carbonat soil, rice, variety Perla de Cuba with one a portion of 0.2 mL/seed. Plants were evaluated 30 days after of germination measuring the growing component in this case. Date were processed for variance multiple analytic and multiple range Duncan test using the statistic program STATGRAPH. The selected strain were CoA-1 of *Azotobacter chroococcum* and P-8 and Azpcub-

2 of *Azospirillum* sp. The fermented Coculture starting from this strain increase the evaluated parameters, overcoat in Broth Nutrient medium. The best variants of moisture were the fermented Coculture in Broth Nutrient and the addition of a bioprepared of *Penicillium* from this moment of application.

INTRODUCCION

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos más difundidos en el mundo. Constituye la principal base alimentaria del 96 % de la población mundial (FAO, 2002). En el país se desarrollan actualmente amplios programas para intensificar la producción de este cultivo, con variedades autóctonas adaptadas a nuestras condiciones, capaces de rendir grandes volúmenes de granos, en las zonas dedicadas tradicionalmente a este cultivo. Paralelo a ello, se busca extender su cultivo a pequeñas áreas, rurales y urbanas, a través del Sub-Programa de Arroz Popular, incluido dentro del Programa del Movimiento Nacional de Agricultura Urbana, lo que hace que se extienda su cultivo a suelos con condiciones no agrícolas, y bajo secano lo que hace necesaria la búsqueda de alternativas para mejorar sus rendimientos. El presente trabajo tiene como objetivos seleccionar las cepas de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum* sp más eficientes en la estimulación del crecimiento en plántulas de arroz en su primera fase y seleccionar el mejor medio de cultivo para establecer el Cocultivo de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum* sp.

MATERIALES Y METODOS

Para las pruebas de estimulación y selección se utilizó un Método de Bioensayo (Dibut, 2000) montado sobre bandejas plásticas de 21 cm de largo, 15.5 cm de ancho y 5 cm de profundidad a las cuales se añadió 1 Kg de un suelo Pardo con Carbonatos, 30 semillas de arroz. Variedad Perla de Cuba y se aplicó una dosis constante de biofertilizantes de 0.2 mL/semilla.

Se utilizaron 13 cepas de *Azotobacter chroococcum*, de las cuales 5 (MB-5, MB-9, MB-23, IB-588 y Glu-3) fueron aisladas de suelos agrícolas de diferentes regiones del país, 7 (CoA 1, 2 SACoA, Metlat, Tecu, C-2, M-3 y M-8) aisladas de distintos tipos de suelos en estados diferentes de México y 1 (BFN-25) procedente de suelos agrícolas de Bogotá, Colombia. Para el caso de *Azospirillum* se incluyeron 5 cepas, 1 Cubana (Azcub-2), 1 Colombiana (IBUN) y 3 aisladas desde raíces y suelos de México (Azosp P-1, P-7 y P-8).

Para la selección de medios para el cocultivo de estas dos bacterias se tomaron las cepas seleccionadas previamente y 5 fórmulas de medios de cultivo que fueron: MPSS, MPAN, CN, DMG e ICIDCA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum* sp.

Para las pruebas fueron utilizadas 13 cepas de *Azotobacter chroococcum* y 5 de *Azospirillum* sp. procedentes de la colección del INIFAT.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con las 13 cepas de *Azotobacter chroococcum* estudiadas sobre los principales parámetros e índices fisiológicos evaluados en las plántulas de arroz.

Tabla 1. Efecto de distintas cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre los componentes del crecimiento en arroz.

Cepas	Largo Raíz	Altura Planta	No. Hojas	Area Foliar Total	Indice Fotosintético	Peso Fresco	Peso Seco
Testigo	10.34 b	8.69 cd	3.29 d	4.20 c	0.66 cd	0.1002 c-e	0.0253
CoA-1	8.13 b	13.51 a	3.81 b	8.43 a	1.14 b	0.1578 a	0.0418
2 SACoA	13.07 a	7.78 d-g	3.08 de	3.31 c-f	0.22 g	0.1070 b-e	0.0285
Teco	13.18 a	13.30 a	4.27 a	7.74 a	0.69 cd	0.1453 a	0.0385
Metlatepec	4.03 c	8.26 d-f	3.04 de	4.17 cd	0.94 bc	0.0981 c-e	0.0208
C-2	8.82 b	7.41 f-i	3.12 de	2.52 fg	0.28 fg	0.1104 b-d	0.0244
M-3	5.35 c	7.62 e-g	3.00 e	2.75 fg	0.61 cd	0.0933 e	0.0230
M-8	4.80 c	6.86 g-i	2.95 e	2.42 fg	0.61 cd	0.0955 de	0.0188
Glu-3	9.27 b	10.84 b	3.78 b	6.20 b	0.61 cd	0.1169 b	0.0322
MB-5	4.33 c	6.51 jk	3.28 d	2.08 g	0.41 e-g	0.1071 b-e	0.0205
MB-9	9.82 b	8.51 c-e	2.91 e	3.28 d-f	0.50 c-e	0.0986 c-e	0.0219
MB-23	4.18 c	6.41 k	3.04 de	2.21 g	0.48 d-g	0.0972 c-e	0.0229
IB-588	3.91 c	9.48 c	3.43 c	5.32 b	1.54 a	0.1093 b-e	0.0247
BFN-25	4.53 c	6.61 h-j	3.00 e	2.24 g	0.51 c-e	0.0986 c-e	0.0206

Las dos cepas que se destacan por lograr la estimulación de la mayor parte de estos parámetros son la CoA-1 y la Teco, seguida por la Glu 3, lo que se debe a la excreción de sustancias fisiológicamente activas de distintos caracteres y al quimiotaxismo existente entre las cepas y la variedad vegetal. Esta aseveración coincide con la de Dibut (2000).

Cuando se cuenta con una variedad de cepas del mismo microorganismo, es muy importante determinar cual posee mayor grado de afinidad con el cultivo porque esa afinidad determinará la estimulación del crecimiento en todas sus fases (Polón y Castro, 1999).

La cepa CoA-1 logra influenciar casi todos los componentes del crecimiento para la primera etapa, superando al resto de las cepas en cuanto a los porcentos de incremento respecto al testigo. Esta cepa logra un alto porcentaje de germinación (90 %), superior al de la variante Testigo (77 %); adelantar en dos días la aparición de la tercera hoja respecto al testigo y a la mayor parte de las cepas empleadas; también incrementa en 55 % la Altura de la Planta, en 16 % el Número de Hojas lo que determinará la aparición más temprana de los hijos que son los que darán resultado en el rendimiento en granos al final del ciclo del cultivo.

También logra aumentos de 101 % en el Area Foliar Total y de 73 % del Indice Fotosintético lo que trae como resultado una mayor superficie dedicada a la toma del dióxido de carbono para el proceso fotosintético y una mayor acumulación de fotosintatos en las células de las plantas, lo que se demuestra en el hecho de que aumentan en 57 y 73 % el Peso Fresco y Seco de las mismas. Sin embargo, como se aprecia en la tabla el largo de la raíz es inferior al testigo, aunque no presenta diferencias significativas, este aspecto supone la disminución de la capacidad de búsqueda de nutrientes por parte de la planta, lo cual se debe a la gran cantidad de sustancias elaboradas, entre las que se incluyen vitaminas, aminoácidos, giberelinas, citoquininas y péptidos de bajo peso molecular que ponen a disposición de las plantas estas bacterias.

Estos resultados coinciden con los expresados por Dibut (2000) al determinar que una cepa de este mismo microorganismo provoca similares niveles de estimulación del crecimiento y el rendimiento en cebolla y con Martínez *et.al* (2001) quienes demuestran el efecto beneficioso de estos biopreparados sobre distintos cultivos de importancia económica en Cuba y otros países.

La cepa Teco por su parte logra incrementar en 27 % el Largo de la Raíz, en 53 % la Altura de la Planta, en 30 % el Número de Hojas, en 84 % el Area Foliar Total, en 5 % el Indice Fotosintético, en 52 % el Peso Fresco y en 45 % el Peso Seco.

El resto de las cepas estudiadas logran influenciar alguno de los parámetros evaluados, sin embargo, los porcentos de incremento que logran son mucho menores que el de estas dos cepas.

Selección de cepas de *Azospirillum*

En el caso de la inoculación con las cepas de *Azospirillum* sp todas alcanzan efectos superiores a la variante testigo sobresaliendo las cepas Azp cub-2 y Azosp P-8. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la aplicación de *Azospirillum* sp sobre componentes del crecimiento en arroz.

Cepas	Largo Raíz	Altura Planta	No. Hojas	Area Foliar Total	Indice Fotosintético	Peso Fresco	Peso Seco
Testigo	7.25 bc	14.05 bc	4.04 c	9.52 c	1.18 c	0.1807 c	0.0524
Azosp P1	6.27 cd	12.83 c	4.35 bc	10.62 bc	1.50 b	0.2096 c	0.0537
Azosp P7	9.70 a	13.85 c	4.48 ab	11.98 a-c	1.18 c	0.2744 b	0.0575
Azosp P8	5.83 d	15.27 ab	4.50 ab	12.42 ab	2.19 a	0.2088 c	0.0519
IBUN	7.88 b	15.26 ab	4.56 ab	13.40 a	1.75 b	0.2927 ab	0.0437
Azp cub2	7.64 bc	16.14 a	4.71 a	13.66 a	1.69 b	0.3455 a	0.0611

La cepa Azp cub-2 incrementa en 5 % el Largo de la Raíz lo que proporciona una mayor profundidad para la toma de nutrientes del suelo, además aumenta la capacidad de absorción al promover la aparición de un gran número de raíces secundarias y pelos absorbentes. También aumenta en 15 % la Altura de la Planta, en 17 % el Número de Hojas, en 44 % el Area Foliar Total y el Indice Fotosintético, en 91 % el Peso Fresco de las plantas y en 17 % el peso seco de las mismas.

Por su parte, la cepa Azosp P8 alcanza porcentos de incremento de 9 % de Altura de la Planta, 11 % respecto al Número de Hojas, 30 % el Area Foliar Total, 16 % el Peso Fresco y en 86 % el Indice Fotosintético respecto al testigo. Sin embargo, no induce una respuesta positiva en la estimulación del Peso Seco y el Largo de la Raíz, aunque no disminuyen el número de raíces secundarias y pelos absorbentes en las mismas.

Esto puede deberse a la producción de algún metabolito inhibitorio de estos procesos, o a la producción de alta cantidad de hormonas que pueden funcionar como inhibidores cuando sus concentraciones son superiores a las esperadas, por la presencia en el medio de cultivo (MPSS) de ácidos orgánicos y otras sales complejas que son empleadas como fuentes de carbono y de iones necesarios para la formación de las mencionadas sustancias.

Del resto de las cepas sobresalen los porcentajes de incremento alcanzados por la cepa Azosp P-7 en algunos de los parámetros evaluados, aunque no son los mayores. Las otras cepas evaluadas logran estimular algún parámetro indistintamente, aunque no la mayoría de los mismos.

Estos resultados no coinciden con lo señalado por Vandenhove *et.al*, (1993) que dice no haber detectado ningún efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas luego de inocularse con biopreparados a partir de cepas de *Azospirillum brasilense* lo cual atribuyó a la competencia con la microflora del suelo.

Muchos otros autores han constatado los efectos beneficiosos provocados por la inoculación de distintas cepas de *Azospirillum* sp sobre cosechas de cultivos económicos debido a la promoción del sistema radical, el incremento de la capacidad para tomar agua y nutrientes del suelo, la fijación biológica del nitrógeno, la inducción de resistencia frente a organismos patógenos, la inhibición de la proliferación de plantas parásitas y la producción de compuestos estimuladores del crecimiento vegetal (Boddey y Dobereiner, 1988).

Okon y Vanderleyden (1997) reportan altas cantidades de fijación de nitrógeno y un mejoramiento general del desarrollo del sistema radical por las plantas. Por otra parte Burdman *et.al*, (2000), señalan un incremento en la inducción de raíces laterales, en la densidad y ramificación de los pelos radicales y la diferenciación de un mayor número de células epidérmicas dentro de los pelos radicales infectados por la aplicación conjunta de *Rhizobium* y *Azospirillum* en plantas leguminosas y no leguminosas.

Selección de medios para el Cocultivo *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum* sp.

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos en cada una de las formulaciones usadas frente a un testigo sin aplicación y a una fermentación de ambos microorganismos puros en los medios de cultivo, en que se producen algunos de los productos comerciales aplicados masivamente en cultivos de importancia económica.

Tabla 3. Efecto de la combinación Cocultivo - Medios de cultivo sobre los componentes del crecimiento en arroz.

Variantes	Largo Raíz	Altura Planta	No. Hojas	Area Foliar Total	Indice Fotos.	Peso Fresco	Peso Seco
Testigo	9.27 ab	11.52 d	2.92 bc	4.83 c	0.51 c	0.1440 cd	0.0252
Azotobacter DMG	9.27 ab	10.84 d	3.00 bc	5.32 bc	0.61 bc	0.1169 e	0.0385
Azospirillum MPSS	6.02 c	14.27 ab	2.95 bc	6.12 ab	0.51 c	0.1558 bc	0.0322
Co DMG	10.44 a	13.28 bc	3.19 ab	5.97 ab	0.82 a	0.1686 bc	0.0542
Co MPSS	8.04 b	12.52 cd	2.83 c	4.97 bc	0.60 bc	0.1502bcd	0.0310
Co MPAN	8.98 ab	13.00 bc	3.10ab c	5.28 bc	0.78 ab	0.1372 d	0.0363
Co CN	9.78 ab	14.03 ab	3.38 a	7.02 a	0.74 ab	0.1970 a	0.0410
Co ICIDCA	8.62 ab	14.95 a	3.08ab c	6.61 a	0.74 ab	0.1733 ab	0.0380

En la tabla se aprecia que la mayoría de las variantes en estudio, estimulan de alguna forma los parámetros evaluados.

Los datos que reflejan los biopreparados obtenidos como Cocultivos son superiores a los que muestran las variantes puras en ambos medios, resultado de una mayor concentración celular y de metabolitos por la interacción de los dos microorganismos.

El Cocultivo obtenido en Caldo Nutriente (CN) incrementó el Largo de la Raíz en 5 %, en 22 % la Altura de la Planta, en 16 % el Número de Hojas, en 45 % el Area Foliar Total, en 46 % el Indice Fotosintético, en 37 % el Peso Fresco y en 62 % el Peso Seco con respecto al testigo.

El Cocultivo obtenido en medio Dimargón incrementó en 13 % el Largo de la Raíz, 15 % en la Altura de la Planta, 9 % del Número de Hojas, 17 % el Peso Fresco, 24 % el Area Foliar Total, 62 % el Indice Fotosintético y 115 % el Peso Seco respecto al testigo y en 13 % el Largo de la Raíz, en 22 % la Altura de la Planta, en 6 % el Número de Hojas, en 44 % el Peso Fresco, en 12 % el Area Foliar Total, en 34 % el Indice Fotosintético y en 41 % el Peso Seco con respecto a la variante pura fermentada en el mismo medio de cultivo.

En el caso de *Azospirillum* se observan incrementos ligeros en la estimulación de la mayoría de los componentes en estudio mostrando diferencias significativas solo en el caso del Indice Fotosintético a favor del Cocultivo en este medio.

Como se puede notar los Cocultivos obtenidos en los medios CN y DMG muestran resultados similares en la estimulación de la mayoría de estos componentes, lo que sugiere que cualquiera de los dos medios puede ser usado para su fermentación, sin embargo, razones de costo determinan al Dimargón como opción más válida puesto que el mismo tiene un costo de 0.25-0.30 CUC/L, mientras que el CN tiene un costo de 0.69-0.75 CUC/L.

El arroz se cultiva tradicionalmente en dos regímenes de humedad muy diferentes (aniego o seco). Esto hace necesaria la búsqueda de un biopreparado capaz de mantener la fijación biológica del nitrógeno en ambas condiciones que sea capaz de estimular el crecimiento y rendimiento de las plantas. Debido a los mecanismos de protección de la enzima nitrogenasa de *Azotobacter* y al hecho de ser una bacteria aerobia estricta, se supone que bajo condiciones de anaerobiosis la fijación biológica del nitrógeno disminuye, aunque es posible que se mantenga la síntesis de compuestos fisiológicamente activos. *Azospirillum* sp es una bacteria microaerofílica, lo que hace posible que mantenga altos niveles de fijación de nitrógeno a bajas tensiones de oxígeno y aún en condiciones anaeróbicas (Kennedy y Tchan, 1992).

Actualmente se abre la posibilidad de contar con biotecnologías para la fabricación de inoculantes mixtos en formas líquidas o sólidas utilizando portadores, sobre todo de carácter orgánico, que permiten lograr importantes ventajas para su aplicación, ya que aprovechan los efectos beneficiosos de los microorganismos que se mezclan, dando como resultado productos finales con densidades de inóculo elevadas que contribuyen a maximizar sus efectos y adaptabilidad a las condiciones del medio (Subba Rao, 1996).

CONCLUSIONES

- Se selecciona la cepa CoA-1 de *Azotobacter chroococcum* por lograr una estimulación integral de los componentes del crecimiento en plántulas de arroz.
- Se seleccionan las cepas Azp cub-2 y Azosp P8 por mostrar similar habilidad para estimular el crecimiento en plántulas de arroz.
- Pueden ser usados para establecer el Cocultivo entre *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum* sp los medios de cultivo Caldo Nutriente y Dimargón.

REFERENCIAS

- Boddey, R. M y Dobereiner, J. 1988.** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future and research. In. **Plant and Soil** 108, 53-65.
- Burdman, S.; Hamaoul, B y Okon, Y. 2000.** Improvement of legume crop yields by co inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Hebrew University of Jerusalem. Israel.

- Dibut, A. B. 2000.** Obtención de bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa* L.). Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. 104 pp.
- FAO, 2002.** Annuary statistic of production
- Kennedy, I. R and Tchan, Y. T. 1992.** Biological Nitrogen Fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. In. **Plant and Soil** 141, 93-118.
- Martínez, V. R.; Dibut, A. B.; Tejeda, G. G y García, G. R. 2001.** Trascendencia Internacional de los Biofertilizantes Cubanos. En. Memorias del XV Congreso Latinoamericano de las Ciencias del Suelo, Varadero, CD.
- Okon, Y y Vanderleyden, J. 1997.** Root associates *Azospirillum* species can stimulate plants. In. **ASM News** 63 (7): 364-370.
- Polón, R y Castro, R. 1999.** La aplicación del estrés hídrico como alternativa para incrementar el rendimiento en el cultivo del arroz. En. **Cultivos Tropicales** 20 (3): 37-39.
- Subba Rao, N. S. 1996.** Interaction of nitrogen-fixing microorganisms with other soil microorganisms. In. Biological Nitrogen Fixation, Ed. Marcel Dekker, Nueva York, 37-63 pp.
- Vandenhove, H.; Merckx, M.; Van Steenbergen, M y Vlassak, K. 1993.** Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. In. **Soil. Biol. Biochem.** Vol 25, N°4, 513-519.