

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Laboratorio de Microbiología Agrícola

Centro de Investigaciones Agronómicas

Universidad de Costa Rica

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE
AZOSPIRILLUM, Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PARA
SUPLIR LAS NECESIDADES DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE
ORYZA SATIVA (ARROZ)**

Informe de Práctica de Especialidad presentado para optar por el grado
de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

Walter Ismael Hernández Ascencio

Cartago Enero, 2003

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *AZOSPIRILLUM*, Y
EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PARA SUPLIR LAS NECESIDADES DE
NITRÓGENO EN PLANTAS DE *ORYZA SATIVA* (ARROZ)**

Informe de Práctica de Especialidad presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Walter Ismael Hernández Ascencio, como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal

Ph.D. Lidieth Uribe Lorío

Profesora asesora

M.Sc. Johnny Peraza Moraga

Lector

Ph.D. Miguel Rojas Chávez

Lector

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al personal del Laboratorio de Microbiología Agrícola del CIA por su apoyo durante la ejecución de esta práctica, al Ing. Rafael Mata por sus recomendaciones y por la ayuda brindada, a los miembros del tribunal evaluador por sus valiosas observaciones, y muy especialmente a la Ph.D. Lidieth Uribe Lorío por su desinteresada ayuda y sus valiosos aportes y sugerencias.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	10
GENERAL.....	10
ESPECÍFICOS.....	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
TAXONOMÍA DE <i>AZOSPIRILLUM</i>	11
ASOCIACIÓN <i>AZOSPIRILLUM</i> - PLANTA	13
UTILIZACIÓN DE <i>AZOSPIRILLUM</i> COMO BIOFERTILIZANTE	14
FERTILIZACIÓN Y REQUERIMIENTOS DE NITRÓGENO EN EL ARROZ.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	16
UBICACIÓN	16
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	16
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS.....	17
IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	18
<i>Tinción de Gram y determinación de la forma celular</i>	18
<i>Prueba oxidasa</i>	19
<i>Tinción de gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB)</i>	19
<i>Movilidad</i>	20
IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE.....	20
<i>Utilización de glucosa como única fuente de carbono</i>	21
EVALUACIÓN DE LAS CEPAS A NIVEL DE INVERNADERO	21
<i>Siembra del arroz</i>	21
<i>Fertilización nitrogenada</i>	22
<i>Inoculación de las cepas</i>	22
<i>Cosecha y determinación del peso fresco del follaje</i>	22
<i>Determinación del peso seco del follaje y las raíces</i>	23
<i>Análisis estadístico</i>	23
RESULTADOS	24
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS.....	24
IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	26
IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE.....	29
EVALUACIÓN DE LAS CEPAS A NIVEL DE INVERNADERO	31
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40

BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXO 1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO Y DE TEXTURA DE LOS SUELOS	44
ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	45
ANEXO 3. DISOLUCIÓN NEGRO SUDÁN B	46

RESUMEN

El arroz es un cultivo básico en la agricultura costarricense, por lo que la búsqueda de opciones de fertilización nitrogenada de bajo costo y amigables con el ambiente no deja de ser importante. Una de estas opciones es el uso de biofertilizantes, para los cuales se puede utilizar la bacteria fijadora de nitrógeno *Azospirillum sp.*

El objetivo de este trabajo fue el de aislar e identificar diferentes cepas de *Azospirillum sp.*, y evaluar su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en un cultivo de arroz en invernadero. Las cepas se aislaron a partir de raíces de arroz, utilizando para ello un medio semisólido libre de nitrógeno, y luego se identificaron mediante estudios morfológicos y bioquímicos. Posteriormente las cepas aisladas fueron inoculadas en el suelo donde crecían las plantas de arroz, siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado.

Se aislaron y purificaron cinco cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno, de las cuales tres se identificaron como *Azospirillum lipoferum*, una como *Pseudomonas floridana* y otra no pudo ser identificada. La inoculación del arroz con estas cepas no produjo aumentos significativos en los pesos fresco y seco de las plantas, y además se observó una alta variabilidad en cuanto su tamaño.

A pesar de que la alta variabilidad de los datos enmascaró el efecto de la inoculación, una de las cepas de *A. lipoferum* mostró tendencia a suplir una parte del nitrógeno requerido por las plantas.

Palabras clave: *Azospirillum*, *Oryza sativa*, arroz, fijación de nitrógeno, biofertilizantes.

ABSTRACT

Rice is a basic crop for Costa Rican agriculture, and the search of cheap and environmental friendly nitrogen fertilization options for this crop is very important. Biofertilizers are a good option, and the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum sp.* can be used for this purpose.

The goal of this work was isolate and identify different strains of *Azospirillum sp.* and evaluate its capacity for supply nitrogen in a greenhouse rice crop. Strains were isolated from rice roots using a semisolid nitrogen free medium, then they were identified by means of morphological and biochemical studies. Afterwards, isolated strains were inoculated in soil where rice plants were growing, with a totally randomized experimental design.

It were isolated and purified five strains of nitrogen fixing bacteria. Three strains were identified as *Azospirillum lipoferum*, one as *Pseudomonas floridana* and the other was not identified. Inoculation of rice with strains did not produce significant increments in fresh and dry weight of plants, and there was high variability in plants size.

In spite of high variability of data masked the effects of inoculation, one of the strains of *A. lipoferum* showed tendency to supply part of nitrogen required for plants.

Keywords: *Azospirillum*, *Oryza sativa*, rice, nitrogen fixation, biofertilizers.

INTRODUCCIÓN

El arroz es un alimento básico en la dieta de la población costarricense, por lo que su cultivo es de significativa importancia dentro del sector agrícola. La fertilización es una práctica indispensable para su producción (Cordero, 1993), siendo la fertilización nitrogenada la más importante debido a sus evidentes efectos sobre el rendimiento (Murillo y González, 1982).

La forma más conocida y empleada para suplir las necesidades de nitrógeno de los cultivos de arroz es la fertilización química, la cual representa una manera rápida de reponer el nitrógeno perdido, sin embargo, bajo un manejo inadecuado representa un riesgo ecológico por contaminación del suelo y del agua (Vergara y Rangel, 1990); por otro lado, también se debe considerar que los fertilizantes representan costos económicos importantes para los productores (Cordero, 1993). Es por ello que es necesario contar con opciones de fertilización que sean amigables con el ambiente y que disminuyan los costos de producción. En este sentido, la fijación biológica de nitrógeno ofrece una manera atractiva, tanto económicamente como ecológicamente, para suplir de este nutriente al suelo (Motasara *et al.*, 1995).

La fijación biológica de nitrógeno en los cultivos de arroz puede ser potenciada mediante el uso de biofertilizantes, los cuales se pueden definir como preparados que contienen cepas microbianas que se aplican al suelo o a las semillas, con el objetivo de incrementar el número de microorganismos en el medio y acelerar los procesos microbianos, aumentando de esta forma las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas (The Latin American Alliance, 1997).

Para lo anterior se pueden utilizar cepas microbianas que habiten en la rizosfera de las plantas, como lo es el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum*, las cuales son capaces de asociarse con las raíces de poáceas (gramíneas) y proveer a estas plantas de nitrógeno fijado (Vergara y Rangel, 1990). La utilización de biofertilizantes se enmarca dentro de lo que se ha llamado agricultura orgánica, la cual se caracteriza por no utilizar

fertilizantes químicos y por respetar las relaciones existentes en la naturaleza (Echeverría *et al.*, 2000). Sin embargo, se debe tener claro que los biofertilizantes no proveen la totalidad de los nutrientes que necesitan los cultivos, y que de hecho se deben utilizar junto a los fertilizantes químicos (Motasara *et al.*, 1995).

El hecho de que la fijación biológica de nitrógeno esté basada en fuentes de energía renovable y libres de contaminación, y que pueda suplir en parte las necesidades de nitrógeno de cultivos como el arroz (Motasara *et al.*, 1995), hace del uso de los biofertilizantes una buena alternativa para la agricultura en Costa Rica, pues con ellos se podrían reducir los costos de producción y disminuir el daño a la naturaleza. Por esta razón es que una de las áreas de investigación del Laboratorio de Microbiología Agrícola, perteneciente al Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica, es la búsqueda de nuevas cepas microbianas que puedan utilizarse para el desarrollo de biofertilizantes.

OBJETIVOS

GENERAL

Aislar e identificar diferentes cepas de la bacteria fijadora de nitrógeno *Azospirillum sp.*, y evaluar su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en un cultivo de arroz en invernadero.

ESPECÍFICOS

- Aislar y purificar, a partir de raíces de arroz, cepas del género *Azospirillum*, utilizando para ello un medio selectivo libre de nitrógeno.
- Confirmar, mediante estudios morfológicos y bioquímicos, que las cepas corresponden al género *Azospirillum*.
- Identificar las cepas a nivel de especie mediante estudios morfológicos y fisiológicos.
- Determinar la respuesta, en cuanto a peso fresco y seco, de plantas de arroz inoculadas con las diferentes cepas aisladas.

REVISIÓN DE LITERATURA

TAXONOMÍA DE *AZOSPIRILLUM*

El género *Azospirillum* fue descubierto por Beijerinck, quien lo nombró como *Spirillum lipoferum* en 1925 (Döbereiner, 1980), y fue caracterizado por Döbereiner y Day en la década de 1970 (Okon *et al.*, 1976, citados por Vergara y Rangel, 1990). En 1978 fue reclasificado por Tarrand, Krieg y Döbereiner, quienes basados en estudios de homología del ADN describieron el nuevo género *Azospirillum*, con dos especies: *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Döbereiner, 1982).

En la última edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg y Holt, 1984) se incluyen solo dos especies dentro del género *Azospirillum*, sin embargo, en la novena edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) se describen cinco especies: *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense* y *A. lipoferum*.

Según estos manuales el género *Azospirillum* comprende bacilos gruesos, ligeramente curvados o rectos, y a menudo con extremos puntiagudos; Gram negativos en cultivos jóvenes, pudiendo ser Gram variables en cultivos envejecidos. Presenta gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato, los cuales pueden constituir entre el 25 y el 50 % del peso seco en células cultivadas en un medio libre de nitrógeno. Es oxidasa positivo.

Al cultivarse en medio líquido o semisólido las bacterias de este género presentan movilidad con un característico movimiento en forma de espiral, tipo "sacacorchos". Desarrollan un solo flagelo polar, sin embargo, al cultivarse en medio sólido algunas especies pueden desarrollar numerosos flagelos laterales (flagelación peritrica).

En cuanto a características fisiológicas, *Azospirillum* posee la capacidad de fijar nitrógeno pero solo bajo condiciones microaerofílicas, debido a que carece de mecanismos para proteger

a la enzima nitrogenasa de la acción del oxígeno. Puede crecer bien bajo concentraciones atmosféricas de O₂, siempre y cuando esté en presencia de una fuente de nitrógeno fijado. Su metabolismo es principalmente de tipo respiratorio, con el O₂, y en algunas cepas el NO₃⁻, como último aceptor de electrones. Bajo concentraciones limitantes de oxígeno algunas cepas pueden reducir el NO₃⁻ a NO₂⁻, o a N₂O y N₂. Con respecto a lo anterior, dentro de las especies *A. lipoferum* y *A. brasilense* pueden distinguirse dos subgrupos, de acuerdo con su capacidad (nir⁺) o incapacidad (nir⁻) para desnitrificar (Döbereiner, 1982). Como fuente de carbono puede utilizar sales de ácidos orgánicos, tales como el malato, succinato, lactato y piruvato; ciertos carbohidratos también pueden ser utilizados. Dos de las especies requieren de biotina para su crecimiento. Algunas cepas crecen bien a pH 7, sin embargo otras prefieren condiciones más ácidas. Para la mayoría de las especies la temperatura óptima de crecimiento está entre 34 y 37 °C.

En medio semisólido libre de nitrógeno *Azospirillum* presenta un crecimiento característico, el cual inicia como un velo delgado varios milímetros o centímetros bajo la superficie, en el punto donde la concentración de O₂ en el medio está en equilibrio con la tasa respiratoria de las células, de manera que no hay un exceso en la cantidad de O₂ disuelto. Conforme las bacterias se multiplican el velo migra hacia la superficie del medio hasta llegar justo debajo de la misma. Si se utiliza el medio NFb se puede observar también un viraje del indicador azul de bromotimol hacia el color azul, debido a la alcalinización del medio causada por la oxidación del malato.

El género *Azospirillum* se encuentra distribuido en casi todo el mundo, y puede encontrarse en el suelo, en la rizosfera y en asociación con raíces de poáceas (gramíneas) y de plantas tuberosas. La mayoría de los aislamientos se han obtenido a partir de cereales y de pastos tropicales.

ASOCIACIÓN *AZOSPIRILLUM* - PLANTA

Las bacterias del género *Azospirillum* pueden establecer asociaciones con las raíces de poáceas, sin embargo estas asociaciones carecen de estructuras visibles que indiquen que la planta se encuentra infectada (Umali-Garcia *et al.*, 1981). Debido a la ausencia de estructuras especializadas y de sustancias como la leghemoglobina, la fijación de nitrógeno en esta asociación es muy variable y depende de factores ambientales y climáticos (Döbereiner, 1979), sin embargo esta relación parece ser lo suficientemente estrecha para sugerir que se trata de un tipo primitivo de simbiosis (Balandreau y Knowles, 1978).

Azospirillum es una bacteria que habita libremente en el suelo, sin embargo su concentración es mayor en la rizosfera (Döbereiner, 1992; citada por Döbereiner, 1995), en donde se adsorbe al mucílago de la superficie radical, principalmente a los pelos radicales (Umali-Garcia *et al.*, 1981).

La infección inicia cuando la bacteria entra a través de pelos radicales lisados y de espacios vacíos creados por la descamación de la epidermis y por la emergencia de raíces laterales (Umali-Garcia *et al.*, 1981), y de ahí se extiende hacia las raíces principales (Krieg y Döbereiner, 1984). Se cree que esta característica invasiva se debe a la producción de pectinliasa y endopoligalacturonasa por parte de la bacteria, enzimas que deshidratan la pectina que mantiene unidas las paredes celulares en los tejidos vegetales (Umali-Garcia *et al.*, 1981).

Azospirillum ha sido observado en espacios intercelulares dentro de los tejidos radicales, así como intracelularmente en células muertas (Krieg y Döbereiner, 1984). Puede habitar diferentes zonas de la raíz, como en el córtex (interno y externo) y la estela de las raíces del maíz (*Zea mays*) (Patriquin and Döbereiner, 1978; citados por Krieg y Döbereiner, 1984).

UTILIZACIÓN DE *AZOSPIRILLUM* COMO BIOFERTILIZANTE

Actualmente los biofertilizantes de nitrógeno están siendo utilizados en muchos países (Motsara *et al.*, 1995), ya que se ha reconocido la aplicación agronómica de los sistemas de fijación biológica de nitrógeno, tales como los sistemas *Azospirillum*-poácea (Umali-Garcia *et al.*, 1984) y *Rhizobium*-fabácea (Giller y Wilson, 1991).

En experimentos de campo la inoculación con *Azospirillum* ha promovido el crecimiento de plantas de importancia agronómica en un 10-20 % (Okon, 1985; Summer, 1990; citados por Zaady y Perevolotsky, 1995). Según Okon y Kapulnik (1986) (citados por Zaady y Perevolotsky, 1995) la inoculación con *Azospirillum* incrementa la producción de materia seca, sin embargo este efecto puede ser benéfico en algunos casos o no significativo en otros (Saito y Graciolli, 1981).

Según Motsara *et al.* (1995) en cultivos como arroz, maíz, trigo y caña de azúcar, *Azospirillum* puede incrementar el rendimiento entre el 15 y el 30 %. En Cuba se han utilizado biofertilizantes a base de esta bacteria que permiten la sustitución del 25% del fertilizante nitrogenado en arroz e incrementan el rendimiento entre el 5 y el 15%. En caña de azúcar la aplicación de biopreparados a base de *Azospirillum* ha producido incrementos en los rendimientos que varían entre el 17 y el 50%, y ha permitido ahorrar entre 50 y 100% del fertilizante nitrogenado (The Latin American Alliance, 1997).

FERTILIZACIÓN Y REQUERIMIENTOS DE NITRÓGENO EN EL ARROZ

El crecimiento de un cultivo de arroz depende de factores como el clima, el agua y los nutrientes accesibles a la planta (Murillo y González, 1982). El nitrógeno es el nutriente más importante, ya que casi todos los suelos son deficientes en este elemento (Cordero, 1993).

El nitrógeno es absorbido en forma de NH_4^+ o NO_3^- por las raíces de las plantas de arroz, y es utilizado en el interior de los tejidos para la síntesis de aminoácidos, los cuales son translocados a las hojas en donde se sintetizan las proteínas (Murillo y González, 1982).

La fertilización nitrogenada se realiza con el fin de promover el desarrollo rápido del cultivo, aumentando la altura y agrandando el tamaño de las hojas (Cordero, 1993). Un suministro adecuado de nitrógeno incrementa el área foliar y la fotosíntesis por unidad de área, lo que da como resultado un mayor rendimiento en la cosecha (Murillo y González, 1982), por el contrario, cuando el suelo es deficiente de este elemento el cultivo se desarrolla mal y las plantas de arroz pierden su color verde normal, hasta tornarse amarillentas (Cordero, 1993).

Se sabe que el nitrógeno aplicado a un cultivo está expuesto a pérdidas hasta del 67 %, por lo que para mejorar la eficiencia de la fertilización ésta se fracciona entre dos y cuatro aplicaciones. Las épocas de aplicación más recomendables son durante el macollamiento, o sea cuando las plántulas presentan cuatro hojas completamente desplegadas, y durante la formación de la panícula, ya que se favorece la fase reproductiva del arroz haciendo que la mayoría de los hijos sean productivos. Con estas aplicaciones se da importancia a dos fases: la vegetativa (entre el inicio del macollamiento y la máxima producción de hijos) y la reproductiva (etapa de diferenciación del primordio floral). No se recomienda fertilizar a la siembra, pues durante la fase de plántula la absorción de nitrógeno es casi nula (CONITTA, 1991).

La dosis recomendada de nitrógeno varía según la variedad y el sistema de cultivo empleado, pero en promedio es de 120 kg N/Ha. Se sugiere aplicar el 40-50 % de la dosis en la fase de macollamiento, y el resto (50-60 %) en la época de diferenciación del primordio floral. Para la fertilización del arroz de secano se puede utilizar urea, sulfato de amonio o nitrato de amonio (Cordero, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN

El estudio se llevó a cabo en el Invernadero y el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas, ubicados en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica, en Sabanilla de Montes de Oca, San José. Se realizó entre los meses de agosto del año 2002 y enero del año 2003.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras se recolectaron en el sector oeste del cantón de Parrita, provincia de Puntarenas. Se muestrearon nueve campos de cultivo de arroz de secano, tomándose entre tres y cuatro muestras por arrozal, para un total de 34. Los arrozales muestreados presentaban diferencias en cuanto a la fase de desarrollo del arroz, sin embargo en todos los casos este comprendía entre la fase de macollamiento y la de floración.

Cada muestra consistió en una planta entera, de aspecto vigoroso y saludable, la cual se extrajo junto con una porción de suelo. Las muestras se introdujeron en bolsas plásticas y se trasladaron el mismo día al laboratorio, donde se almacenaron a temperatura ambiente y se procesaron en el transcurso de una semana.

De cada arrozal se tomó una muestra compuesta de suelo a partir de las tres o cuatro submuestras recolectadas. Dichas muestras de suelo se remitieron al Laboratorio de Suelos y Foliare, donde se les realizó un análisis químico y de textura (Anexo 1). Los análisis mostraron que el pH, la textura y la fertilidad del suelo, evaluada mediante la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE), eran adecuados para el cultivo del arroz.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS

El método seguido para el aislamiento de *Azospirillum* se basó en el descrito por Döbereiner (1980), sin embargo se realizaron varias modificaciones con el fin de adaptarlo a los recursos disponibles en el laboratorio.

Se tomaron las raíces de las plantas de arroz y se limpiaron cuidadosamente, tratando de no dañarlas. Luego se lavaron generosamente con agua de tubo para eliminar los restos de suelo, y se cortaron en trozos de entre aproximadamente 1,5 y 2 cm de longitud.

Los trozos de raíz se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio ($\text{NaClO}_{(\text{ac})}$) al 2% por cinco minutos, y luego se lavaron tres veces con agua desionizada estéril. Posteriormente se introdujeron en tubos con 10 ml de medio NFb semisólido (Anexo 2), a razón de un trozo de raíz por tubo. Se realizaron tres repeticiones por muestra, para un total de 102 tubos, los cuales se incubaron a 28 °C por una semana.

Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron los tubos que presentaron el crecimiento de un velo espeso de color blanco, entre 0,5 y 1,5 mm bajo la superficie, y que viraron el color del medio de verde a azul. Estos se rayaron en medio NFb sólido complementado con 20 mg/L de extracto de levadura, y se incubaron a 28 °C durante cinco días, transcurridos los cuales se escogieron los que viraron el medio de color verde a azul y presentaron el crecimiento de colonias blancas y pequeñas. Se tomó una de estas colonias por plato y se transfirió nuevamente a NFb semisólido, incubándose a 28 °C por una semana.

Transcurrida la semana de incubación, se tomaron los tubos que presentaron nuevamente el crecimiento de un velo blanco y espeso bajo la superficie, y se rayaron en medio BMS (Anexo 2), incubándose también a 28 °C durante cinco días. De estos cultivos se escogieron colonias de tamaño mediano y con tonalidad rosada o blanca, y se rayaron nuevamente en BMS para purificar, incubando a 28°C por cinco días.

Las colonias se transfirieron otra vez a medio NFb semisólido, y se incubaron a 28 °C por una semana. Se seleccionaron las cepas que presentaron el crecimiento característico del velo pocos milímetros bajo la superficie.

Por último, para comprobar la pureza de las cepas seleccionadas éstas se rayaron en agar nutritivo (AN) (Anexo 2) y se incubaron a 35 °C por 48 horas. Posteriormente se procedió a su identificación.

IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Para confirmar si las cepas aisladas correspondían al género *Azospirillum* se utilizaron los criterios descritos en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Criterios utilizados para la identificación del género *Azospirillum*.

Prueba	Resultado
Forma celular	Bacilos ligeramente curvados o rectos.
Tinción de Gram	-
Oxidasa	+
Presencia de gránulos de poli- β -hidroxibutirato	+
Movilidad	+ Con movimientos en forma de espiral.

Fuente: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994.

Tinción de Gram y determinación de la forma celular

Para realizar la tinción de Gram se utilizaron cultivos en AN con 48 horas de incubación a 35 °C, los cuales fueron teñidos siguiendo la modificación de Hucker (Fernández *et al.*, 1978). Se determinó la reacción de Gram y la morfología celular de cada una de las cepas.

Prueba oxidasa

La prueba oxidasa se realizó con cultivos en AN incubados por 48 horas a 35 °C. Se utilizaron palillos de madera estériles y discos comerciales con 0,9 mg de P-aminodimetilanilina.

Tinción de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB)

Para esta prueba se utilizaron cultivos de 24 y 48 horas incubados a 35 °C en NFb semisólido. La tinción de gránulos de PHB se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Bradshaw (1976), el cual se describe a continuación:

1. Preparar un frotis del velo en un portaobjetos limpio. Secarlo al aire y fijarlo a la llama.
2. Cubrir el portaobjetos con negro Sudán B (Anexo 3) y dejar reaccionar por no menos de 10 minutos. Eliminar el exceso de colorante y secar colocando una tira de papel secante sobre el frotis hasta que todo el colorante se absorba. Evitar mover o restregar el papel durante el secado. Levantar el papel con cuidado.
3. Lavar el frotis con unas gotas de xilol para eliminar el exceso de colorante y volver a secar con papel secante.
4. Contra teñir con safranina acuosa al 5% m/v durante 10 a 15 segundos. Lavar inmediatamente con agua de tubo y dejar secar al aire.
5. En el microscopio y con el objetivo de inmersión examinar la preparación para detectar las partículas, las cuales aparecerán de color azul o negro en contraste con el rojo del citoplasma.

Movilidad

Para observar la movilidad de cada cepa se inoculó una colonia en un vial con 5 ml de caldo nutritivo. Los viales se incubaron en agitación constante y a temperatura ambiente durante 48 horas.

Se colocaron dos gotas del cultivo en un portaobjetos limpio y se cubrió con un cubreobjetos. La preparación se observó bajo el microscopio con el objetivo 40x. Para lograr contraste y poder observar las células se oscureció el campo mediante el uso del diafragma.

IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

Las cepas que fueron confirmadas como pertenecientes al género *Azospirillum* fueron identificadas a nivel de especie siguiendo los criterios presentados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Criterios utilizados para identificar las cepas de *Azospirillum* a nivel de especie.

Prueba	Especie		
	<i>A. amazonense</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. lipoferum</i>
Morfología colonial en medio BMS	Colonias blancas y planas	Colonias rosadas, convexas y rugosas	Colonias rosadas, convexas y rugosas
Utilización de glucosa como única fuente de carbono	+	-	+

Fuente: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994.

Las cepas que no fueron clasificadas como *Azospirillum* se identificaron utilizando el sistema de identificación Biolog®.

Utilización de glucosa como única fuente de carbono

El procedimiento seguido para esta prueba se basó en el descrito por Krieg y Döbereiner (1984). Se transfirió una asada de un cultivo crecido en medio NFb semisólido a un tubo con 10 ml de medio semisólido con glucosa y libre de nitrógeno (se elimina el azul de bromotimol y se reemplaza el ácido málico por 1% m/v de glucosa esterilizada mediante filtración). Los tubos se incubaron a 35 °C por tres días, transcurridos los cuales se tomaron como positivos los que mostraron el crecimiento de un velo blanco y espeso justo debajo de la superficie.

EVALUACIÓN DE LAS CEPAS A NIVEL DE INVERNADERO

Para evaluar las cepas aisladas se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con los siguientes tratamientos: 1) control (sin inoculación y sin fertilizante), 2) fertilización con urea, 3) inoculación con la cepa 3.2, 4) inoculación con la cepa 4.4, 5) inoculación con la cepa 5.2, 6) inoculación con la cepa 7.2 y 7) inoculación con la cepa 9.1. De cada tratamiento se hicieron cinco repeticiones, cada una de las cuales consistió en un pote con cuatro plantas de arroz.

Siembra del arroz

Se utilizó un suelo de textura franco arcillo-arenosa y con un pH de 5,8 (Anexo 1), procedente de una finca en la que se cultivó arroz en años anteriores. La finca se ubica en Tárcoles de Garabito, Puntarenas.

Se colocaron 2 kg de suelo en potes con 14 cm de diámetro y con agujeros en la base. Posteriormente el suelo se saturó con agua y cada pote se colocó en un recipiente lleno de agua, con el fin de mantener un riego constante por capilaridad.

Se utilizaron semillas de arroz de secano y que presentaban casi un 100 % de germinación. Las semillas se sembraron a razón de siete por pote, aproximadamente a 0,5 cm de profundidad. Los potes fueron raleados 35 días después de la siembra, eliminando las plantas más pequeñas, para finalmente conservar cuatro por pote.

Fertilización nitrogenada

La dosis utilizada para la fertilización fue de 120 kg N/Ha, que en el experimento equivalía a 0,402 g de urea por pote y se aplicó en forma de disolución acuosa. La fertilización se fraccionó en dos partes, la mitad a la siembra y la otra mitad 35 días después.

Inoculación de las cepas

El inoculante se preparó suspendiendo el crecimiento de dos platos Petri de cada una de las cepas (rayados por estría en AN e incubados a 35 °C por 48 h) en 100 ml de agua desionizada estéril.

Se realizaron dos inoculaciones, la primera a la siembra, añadiendo 20 ml de la suspensión de bacterias (entre 600 y 900 millones de células/ml) a cada uno de los potes. La segunda inoculación se realizó 35 días después de la siembra, aplicando 5 ml de la suspensión en la base de cada una de las plantas (en este caso la suspensión tenía una concentración aproximada a 300 millones de células/ml).

Cosecha y determinación del peso fresco del follaje

Las cosecha se efectuó 76 días después de la siembra. Se cortó a nivel del suelo el sistema

aéreo de las plantas y se determinó su peso fresco, y posteriormente se extrajeron cuidadosamente las raíces y se lavaron abundantemente con agua de tubo para eliminar los restos de suelo.

Para determinar el peso fresco del follaje se pesaron juntos los sistemas aéreos de las cuatro plantas, y luego se calculó el promedio g/planta en cada pote. Esta medición se realizó inmediatamente después de la cosecha para evitar variaciones por deshidratación.

Determinación del peso seco del follaje y las raíces

Para determinar el peso seco de las muestras éstas fueron introducidas en bolsas de papel y secadas a 80 °C por 48 horas en el caso del follaje, y a 100 °C por 24 horas en el caso de las raíces. Transcurrido el tiempo de secado las muestras se pesaron en una balanza analítica y se calculó el promedio g/planta en cada pote.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se aplicó un análisis de varianza, tomando en cuenta las tres variables de peso fresco del follaje, peso seco del follaje y peso seco de la raíz. En los casos donde se encontró diferencia significativa se realizó la prueba de Tukey para determinar cuáles de los tratamientos fueron diferentes con respecto al control.

RESULTADOS

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS

De los 102 tubos de medio NFb semisólido inoculados con las raíces, solo diez presentaron el crecimiento característico de un velo blanco y espeso (0,5 - 1 mm bajo la superficie) y cambiaron el color del medio de verde a azul (Figura 1). A partir de estos tubos se aislaron cinco cepas, para un porcentaje de aislamiento del 50%. Las cinco cepas aisladas se denominaron como 3.2, 4.4, 5.2, 7.2 y 9.1.

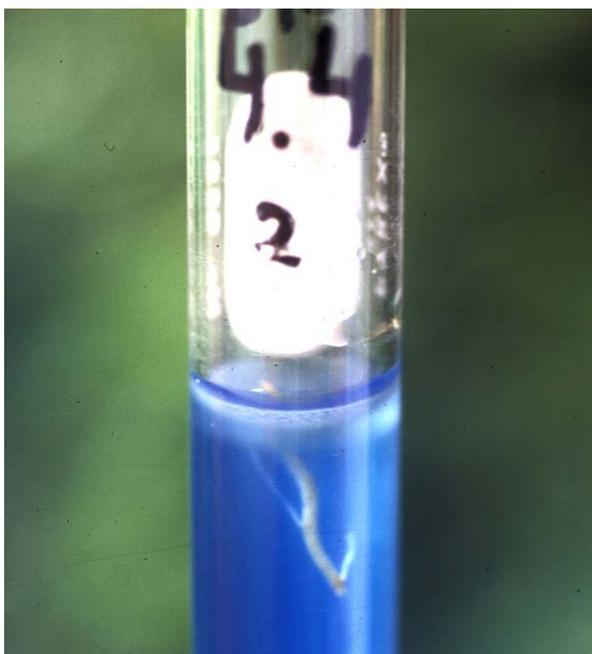


Figura 1. Medio NFb semisólido inoculado con un trozo de raíz e incubado a 28°C durante una semana. Se puede observar la presencia de un velo blanco bajo la superficie, a partir del cual se aisló la cepa 4.4.

Las cepas crecieron en NFb sólido como colonias pequeñas y blancas, y ocasionaron que el medio virara a azul (Figura 2), sin embargo las cepas 3.2, 4.4 y 9.1 eran rugosas, de consistencia dura y parcialmente inmersas en el agar, mientras que las cepas 5.2 y 7.2 eran convexas, de borde entero y consistencia suave. En medio BMS las cepas 3.2, 4.4 y 9.1

crecieron como colonias de color rosado claro, rugosas, de consistencia dura y parcialmente inmersas en el agar (Figura 3); la cepa 5.2 creció en forma de colonias grandes, blancas, planas y mucosas, mientras que la cepa 7.2 creció como colonias de tonalidad rosada, redondas, convexas, de borde entero y de consistencia suave.

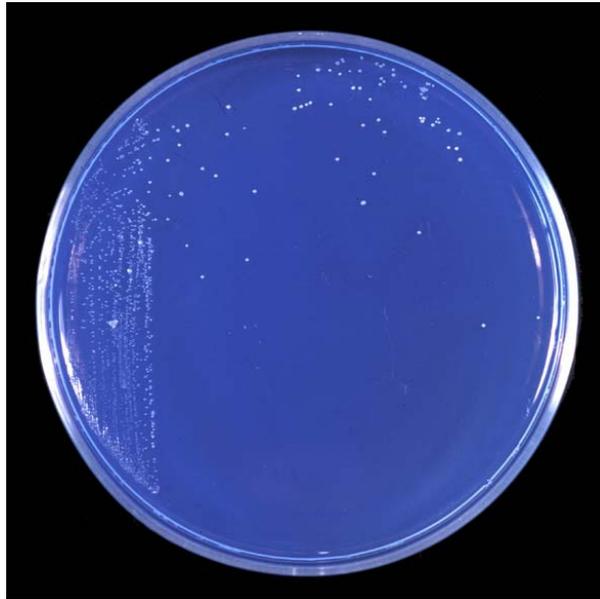


Figura 2. Crecimiento de la cepa 4.4 en medio NFb sólido (con cinco días de incubación a 28 °C).



Figura 3. Crecimiento de la cepa 4.4 en medio BMS (con cinco días de incubación a 28 °C).

IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

En el Cuadro 3 se observan los resultados de las pruebas realizadas a las cepas aisladas con el fin de confirmar o descartar su pertenencia al género *Azospirillum*.

Cuadro 3. Resultados de las pruebas realizadas a las cepas para confirmar su pertenencia al género *Azospirillum*.

Prueba	Cepa				
	3.2	4.4	5.2	7.2	9.1
Gram	-	-	-	-	-
Morfología celular	Bacilos curvados	Bacilos curvados	Bacilos curvados	Bacilos cortos, curvados, muy pequeños	Bacilos rectos y curvados
Oxidasa	+	+	+	-	+
Presencia gránulos PHB	24 h	No se realizó	+	-	-
	48 h	+	+	-	+
Movilidad	+ Con movimientos en espiral	+ Con movimientos en espiral	+ Con movimientos serpenteantes	-	+ Con movimientos en espiral

Como se puede observar en el cuadro anterior las cinco cepas aisladas fueron Gram negativas, pero solo cuatro de ellas (3.2, 4.4, 5.2 y 9.1) mostraron la morfología en forma de bacilos curvados o rectos típica de *Azospirillum* (Figuras 4 y 5). Estas mismas cuatro cepas resultaron ser positivas para la prueba oxidasa, sin embargo la cepa 5.2 presentó una reacción más débil que las otras tres.



Figura 4. Tinción de Gram de la cepa 4.4, cultivada en medio AN durante 48 horas a 35 °C. 1000x.



Figura 5. Tinción de Gram de la cepa 9.1, cultivada en medio AN durante 48 horas a 35 °C. 1000x.

Las cepas 3.2, 4.4 y 9.1 exhibieron gránulos intracelulares de PHB (Cuadro 3). Como se observa en las Figuras 6, 7 y 8 la producción de estos gránulos se incrementó con el tiempo de cultivo, causando que a las 48 horas las células se tiñeran totalmente de negro. Al parecer existe diferencia entre las cepas con respecto a la producción de PHB, ya que la cepa 4.4 presentó gránulos a las 24 horas mientras que la cepa 9.1 los presentó solo a las 48 horas.

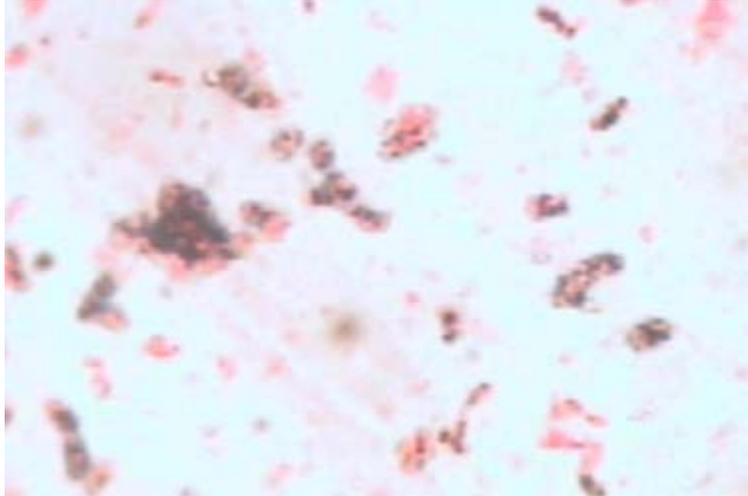


Figura 6. Tinción de gránulos de poli- β -hidroxibutirato en un cultivo de 24 horas de la cepa 4.4, cultivada en NFb semisólido a 35 °C.
1000x.



Figura 7. Tinción de gránulos de poli- β -hidroxibutirato en un cultivo de 48 horas de la cepa 4.4, cultivada en NFb semisólido a 35 °C.
1000x.



Figura 8. Tinción de gránulos de poli- β -hidroxibutirato en un cultivo de 48 horas de la cepa 9.1, cultivada en NFb semisólido a 35 °C. 1000x.

En cuanto a movilidad, las cepas la 3.2, 4.4 y 9.1 exhibieron los movimiento en forma de espiral típicos de *Azospirillum sp.*, mientras que la cepa 5.2 exhibió movimientos serpenteantes que no corresponden a este género (Cuadro 3).

Basándose en estos resultados se determinó que solo las cepas 3.2, 4.4 y 9.1 pertenecían al género *Azospirillum*, por lo que se procedió a realizarles más pruebas para identificarlas a nivel de especie.

IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de las dos pruebas realizadas a las cepas que fueron identificadas como *Azospirillum sp.*, con el fin de determinar su especie.

Cuadro 4. Resultados de las pruebas realizadas a las cepas de *Azospirillum* para identificarlas a nivel de especie.

Prueba	Cepa		
	3.2	4.4	9.1
Morfología colonial en medio BMS	Colonias rosadas, convexas y rugosas	Colonias rosadas, convexas y rugosas	Colonias rosadas, convexas y rugosas
Utilización de glucosa como única fuente de carbono	+	+	+

Como se observa en el cuadro anterior, las tres cepas estudiadas mostraron los mismos resultados en cuanto a morfología colonial y capacidad para utilizar glucosa. Estos resultados permitieron identificar a las tres cepas como *Azospirillum lipoferum*.

Con base en los resultados generados por el sistema Biolog® (Figura 9), la cepa 5.2 fue identificada como *Pseudomonas floridana*, mientras que la cepa 7.2 no reaccionó, por lo que se llevarán a cabo nuevas determinaciones para realizar su identificación.

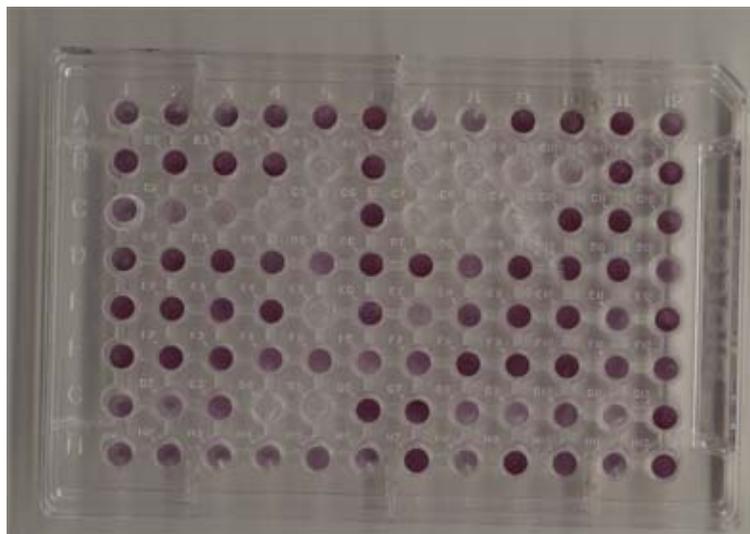


Figura 9. Resultado de la cepa 5.2 al reaccionar en el sistema Biolog®. Los pozos violeta indican una prueba positiva, mientras que los pozos incoloros indican una prueba negativa.

EVALUACIÓN DE LAS CEPAS A NIVEL DE INVERNADERO

Transcurridos 35 días a partir de la siembra las plantas de arroz presentaban en su mayoría tres hojas (Figuras 10 y 11). A simple vista no se observaban diferencias entre el control y los tratamientos con las cepas, sin embargo si habían diferencias en comparación con el tratamiento fertilizado. Como se puede observar en la Figura 11, las plantas a las que se les aplicó urea eran altas y de color verde, mientras que el control y los demás tratamientos presentaban plantas pequeñas y un poco amarillentas.



Figura 10. Apariencia de las plantas de arroz transcurridos 35 días a partir de la siembra.



Figura 11. Comparación entre el control y dos de los tratamientos, transcurridos 35 días a partir de la siembra. Izquierda, control. Centro, urea. Derecha, cepa 4.4.

Al momento de la cosecha (76 días después de la siembra) las plantas habían aumentado en tamaño (Figura 12), sin embargo se observaba la misma tendencia: las plantas fertilizadas con urea eran más altas y de color más verde que el control y que los tratamientos con las cepas, lo cual se puede apreciar en la Figura 13.

Se observó heterogeneidad en cuanto al tamaño de las plantas dentro de cada uno de los tratamientos y el control, a excepción del tratamiento con urea, en el cual el tamaño de las plantas era más uniforme.



Figura 12. Apariencia de las plantas de arroz al momento de la cosecha.



Figura 13. Comparación entre los tratamientos al momento de la cosecha. En orden de izquierda a derecha: control, urea, 3.2, 4.4, 5.2 y 7.2.

Los promedios obtenidos para el peso fresco del follaje, el peso seco del follaje y el peso seco radical en cada uno de los tratamientos se muestran en el Cuadro 5. Se puede observar que el mayor promedio, tanto en peso fresco como en peso seco lo posee en el tratamiento con urea.

Entre los tratamientos con las cepas, la que presenta el mayor promedio para las tres variables es la cepa 9.1. En casi todos los tratamientos, exceptuando el tratamiento con urea, las desviaciones estándar son muy altas en comparación con los promedios, como lo demuestran los elevados coeficientes de variación, lo que explica la heterogeneidad observada en el tamaño de las plantas.

Cuadro 5. Resultados del peso fresco y seco de las plantas de arroz obtenidos en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Variable								
	Peso fresco follaje (g/planta)			Peso seco follaje (mg/planta)			Peso seco raíz (mg/planta)		
	Promedio	S	C.V.	Promedio	S	C.V.	Promedio	S	C.V.
Control	0,42 ^b	0,34	81,0	75 ^b	56	74,7	32 ^b	31	96,9
Urea	1,72 ^a	0,37	21,5	300 ^a	58	19,3	145 ^a	41	28,3
3.2	0,46 ^b	0,37	80,4	80 ^b	62	77,5	26 ^b	25	96,2
4.4	0,53 ^b	0,38	71,7	89 ^b	62	69,7	36 ^b	32	88,9
5.2	0,67 ^b	0,30	44,8	123 ^b	55	44,7	53 ^b	33	62,3
7.2	0,65 ^b	0,32	49,2	127 ^b	62	48,8	55 ^b	37	67,3
9.1	0,71 ^b	0,28	39,4	176 ^b	109	61,9	55 ^b	28	50,9

a, b. Letras diferentes implican diferencias significativas para un $\alpha=0,05$.

El análisis de varianza de los datos ($\alpha = 0,05$) mostró que existía diferencia significativa en al menos uno de los tratamientos. Al aplicar la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) se determinó que no había diferencia entre las plantas inoculadas con las cepas y el control, en ninguna de las tres variables analizadas (peso fresco del follaje, peso seco del follaje y peso seco radical), mientras que el tratamiento con urea sí mostró diferencia significativa para las tres variables con respecto al control.

DISCUSIÓN

Las cepas aisladas presentaron el crecimiento de un velo pocos milímetros bajo la superficie en un medio libre de nitrógeno, con lo que se concluye que las cinco son fijadoras de N_2 bajo condiciones microaerofílicas, característica que no pertenece solo al género *Azospirillum*, sino que esta presente en un grupo diverso de bacilos Gram negativos (Holt *et al.*, 1994).

El hecho de que las cepas se hayan aislado a partir de raíces desinfectadas superficialmente no es prueba de que estuvieran en simbiosis en el interior de la raíz, pues según van Berkum *et al.* (1982) la desinfección con NaClO reduce significativamente la capa de bacterias en la superficie radical, pero no asegura su esterilidad. Esto aumenta las posibilidades de contaminación con bacterias no simbióticas, las cuales pueden competir y desplazar a *Azospirillum sp.* y a otras bacterias fijadoras de N_2 , lo que explicaría el bajo porcentaje de aislamiento (50 %) obtenido a partir de los diez tubos que fueron positivos para el crecimiento de velo y que viraron el color del medio. Sin embargo se debe tener presente que la desinfección no puede ser muy prolongada, ya que una larga exposición al NaClO podría eliminar incluso las cepas de *Azospirillum* habitantes del interior de la raíz.

Los gránulos de PHB se pueden apreciar con más detalle en los cultivos de 24 horas (Figura 6), sin embargo, debido a las diferencias existentes entre las cepas en cuanto a la producción de estos gránulos, y a que en el caso de la cepa 9.1 éstos no se observaron a las 24 horas de cultivo (Cuadro 3), es recomendable no descartar la tinción a las 48 horas con el fin de evitar falsos negativos.

La cepa 7.2 no presentó la movilidad en forma de espiral característica de *Azospirillum sp.* (Cuadro 3), sin embargo se trata de una especie flagelada, pues su crecimiento en medio semisólido, el cual iniciaba como un velo tenue varios centímetros bajo la superficie y que luego migraba justo debajo de la misma, sugiere que esta cepa posee algún tipo de locomoción.

La identificación de *Azospirillum* a nivel de especie no tomó en cuenta a las especies *A. irakense* y *A. halopraeferans*. En el caso de *A. irakense* esto se debió a que no se encontró información sobre su morfología colonial en los medios utilizados para el aislamiento, sin embargo no es probable que las cepas aisladas pertenezcan a esta especie, ya que según Khammas *et al.* (1989) sus características fenotípicas son muy similares a *A. amazonense*. La especie *A. halopraeferans* fue descartada desde un principio, pues para su cultivo se requiere una concentración elevada de NaCl, un pH alto y una temperatura de 41°C (Reinhold *et al.*, 1987; citado por Döbereiner, 1995), condiciones que no fueron proporcionadas durante el proceso de aislamiento.

Para la evaluación en el invernadero se utilizaron todas las cepas aisladas, ello debido a que si bien dos de ellas no pertenecen al género *Azospirillum*, se trata de fijadores de nitrógeno que eventualmente podrían utilizarse como biofertilizantes.

Los resultados finales obtenidos en el experimento ya se podían predecir al observar el desarrollo de las plantas a los 35 días de la siembra, pues las del control y de los tratamientos con las cepas eran pequeñas y amarillentas en comparación con las plantas fertilizadas (Figura 11), lo cual indicaba una deficiencia de nitrógeno en el suelo. En esa ocasión se pudo pensar que tal efecto se debía a la disminución de la población de bacterias entre el momento de la siembra y la germinación, con lo que las raíces jóvenes no se habrían infectado. Sin embargo esto se descartó con la segunda inoculación, en la que las raíces ya estaban desarrolladas y tenían mayores posibilidades de ser infectadas, y sin embargo se mantuvo la misma tendencia hasta el día de la cosecha (Figura 13).

Si bien no hubo incremento significativo en los pesos fresco y seco de las plantas inoculadas con las cepas, no se puede tener certeza de estos resultados, pues la alta variabilidad pudo enmascarar las diferencias entre los tratamientos con las cepas y el control.

Como puede verse en la Cuadro 5, el tratamiento con urea presentó menor variabilidad. Esto se debió a que al tener una fuente adecuada de nitrógeno las plantas pudieron desarrollarse en forma óptima, lo cual permitió un crecimiento bastante uniforme.

En el caso del control, en el cual no existía una fuente adecuada de nitrógeno, las plantas tuvieron un desarrollo deficiente, por lo que no se dio un crecimiento uniforme. Lo mismo puede decirse de los demás tratamientos con las cepas, en los cuales la fijación de nitrógeno en la asociación bacteria-planta (si la hubo) no constituyó una fuente adecuada de este nutriente, produciéndose el mismo crecimiento de plantas pequeñas, heterogéneas en tamaño y un poco cloróticas.

Los coeficientes de variación (Cuadro 5) ilustran las tendencias mencionadas anteriormente, pues sus valores son muy altos en los tratamientos no fertilizados químicamente, mientras que en el tratamiento con urea su valor es bastante bajo. Esto indica que los problemas de variabilidad podrían ser resueltos aplicando a todos los tratamientos una dosis de nitrógeno de arranque, lo que permitiría a las plantas iniciar un desarrollo más adecuado que se traduzca en un crecimiento homogéneo entre las plantas.

No es probable que las características químicas y físicas del suelo fueran por sí solas la causa de las variaciones, pues sin tomar en cuenta su deficiencia en nitrógeno, el suelo utilizado poseía un pH de 5,77, una CICE alta y una textura franco arcillo-arenosa (Anexo 1), condiciones que según Murillo y González (1982) son óptimas para el crecimiento del arroz.

Puede que las cepas de *Azospirillum sp.* aisladas no fueran habitantes del interior de las raíces y no fueran capaces de establecer asociación con el arroz. El hecho de que las muestras utilizadas hayan sido plantas de aspecto vigoroso y saludable no quiere decir que las bacterias presentes en sus raíces sean responsables de ese crecimiento, pues los arrozales estaban recibiendo un manejo agronómico y la apariencia de las plantas se debía a la aplicación de fertilizantes. Para seleccionar cepas adecuadas sería más recomendable utilizar plantas de

arroz crecidas bajo condiciones de aplicación mínima de fertilizantes, como es el caso de los arrozales pertenecientes a agricultores con bajos insumos, de manera que se tenga mayor seguridad de que las plantas de mejor aspecto sean producto de fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo los suelos seleccionados no deben ser deficientes en nitrógeno, pues se deben buscar cepas tolerantes a la presencia de fertilizantes nitrogenados que puedan ser utilizadas como parte de un programa de fertilización integrado, pensando en el hecho de que la simbiosis *Azospirillum*-arroz solo provee una parte del nitrógeno requerido por la planta y no se puede prescindir de los fertilizante químicos.

A pesar de que estadísticamente no hay diferencia significativa, se puede observar en el Cuadro 5 que el promedio de las plantas inoculadas con la cepa 9.1 es bastante mayor que el del control en las tres variables analizadas. Esto, sumado al hecho de que su coeficiente de variación es el segundo más bajo, sugiere que esta cepa probablemente si estableció una asociación con el arroz, proporcionándole nitrógeno para un mayor crecimiento, sin embargo este efecto quedó enmascarado por la alta variabilidad presentada.

CONCLUSIONES

- La formación de un velo blanco bajo la superficie y el viraje a azul en el medio NFb semisólido no es un indicador exclusivo de la presencia *Azospirillum sp.*
- La morfología de colonias rugosas y de consistencia dura, blancas en NFb sólido y rosadas en BMS, es un buen indicador de que se ha aislado *Azospirillum sp.*
- Existen diferencias entre las cepas de *A. lipoferum* aisladas en cuanto a la velocidad de acumulación de gránulos de poli- β -hidroxibutirato, criterio que puede ser utilizado para su caracterización.
- El nitrógeno es necesario para que exista homogeneidad en el crecimiento de las plantas de arroz de un experimento.
- La cepa 9.1 parece tener potencial para ser utilizada como biofertilizante, pues mostró tendencia a suplir parte del nitrógeno requerido por las plantas.

RECOMENDACIONES

- Realizar las tinciones de gránulos de poli- β -hidroxibutirato en cultivos de 48 horas, con el fin de evitar que se den falsos negativos.
- Realizar la caracterización de las cepas aisladas, de manera que se de inicio a una colección elaborada de cepas de *Azospirillum sp.*
- Repetir el experimento de inoculación de las cepas aplicando una dosis de nitrógeno de arranque a la siembra, con el fin de obtener un crecimiento más homogéneo de las plantas y disminuir la variabilidad.
- Realizar más aislamientos de *Azospirillum sp.* para aumentar la probabilidad de encontrar cepas que puedan usarse como biofertilizantes; sin embargo es preferible realizarlos a partir de plantas de arroz crecidas en suelos que reciban los insumos mínimos.

BIBLIOGRAFÍA

- Balandreau, J. y Knowles, R. 1978. The Rhizosphere. En: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Editado por Y.R. Dommergues y S.V. Krupa. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam, The Netherlands. pp. 249, 250.
- Bradshaw, L.J. 1976. Microbiología de Laboratorio. Traducido del inglés por Gonzalo Peña. El Manual Moderno. México, D.F., México. pp. 26-28, 231.
- CONITTA. 1991. Arroz. MAG-UNED. San José, Costa Rica. pp. 20-21.
- Cordero, A. 1993. Fertilización y nutrición mineral del arroz. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp. 9, 61-74.
- Döbereiner, J. 1979 . “Fixação de Nitrogênio em Gramíneas Tropicais”. Interciencia 4(4): 200-206.
- Döbereiner, J. 1980. Forage Grasses and Grain Crops. En: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Editado por F. J. Bergersen. John Wiley & Sons. pp. 545, 549-555.
- Döbereiner, J. 1982. Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative N₂-fixing organisms. En: Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Editado por P. H. Graham. CIAT. pp. 469-483.
- Döbereiner, J. 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Editado por Kassem Alef y Paolo Nannipieri. Academic Press Limited. London, Great Britain. pp. 134-139.

- Echeverría, F; Castro, M. y Arias, V. 2000. Plan de Acción 2000. ProGramma Nacional de Agricultura Orgánica. IICA. San José, Costa Rica. pp. 7, 8.
- Fernández, B.; Brunker, T. y Ryan, K. 1978. Microbiología Básica y Aplicada. Manual de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp. 6, 7, 9, 117.
- Giller, K.E. y Wilson, K.J. 1991. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems. CAB International. United Kingdom. pp. 19-20.
- Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J. y Williams, S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp. 39, 40, 43, 47, 56.
- Krieg, N. y Döbereiner, J. 1984. Genus *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. Editado por Noel Krieg y John Holt. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp. 94-104.
- Motsara, MR.; Bhattacharyya, P. y Srivastava, B. 1995. Biofertiliser Technology, Marketing and Usage. Fertiliser Development and Consultation Organisation. New Delhi, India. pp. 1, 2, 4-8, 12, 13, 57, 58.
- Murillo J. y González, R. 1982. Manual de producción para arroz de secano en Costa Rica. Segunda edición. CAFESA. San José, Costa Rica. pp. 24-27, 47-50, 72, 73.
- Saito, S.M.T. y Graciolli, L.A. 1981. Relationships between *Azospirillum spp.* isolates from maize and sugar cane. En: Associative N₂-Fixation. Volume II. Editado por: P. Vose y A. Ruschel. CRC Press. Florida, U.S.A. pp. 163-168.
- The Latin American Alliance. 1997. Los biofertilizantes en la agricultura cubana. <http://www.latinsynergy.org/microorganismoscuba2.htm>

- Umali-Garcia, M.; Hubbell, D.H.; Gaskins, M.H. y Dazzo, F.B. 1984. Adsorption and mode of entry of *Azospirillum brasilense* to grass roots. En: Associative N₂-Fixation. Volume I. Editado por: P. Vose y A. Ruschel. CRC Press. Florida, U.S.A. pp. 49-62.
- Van Berkum, P.; McClung, C.R. y Sloger, C. 1982. Some pertinent remarks on N₂ fixation associated with the roots of grasses. En: Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Editado por P.H. Graham y S.C. Harris. CIAT. Cali, Colombia. pp. 513-525.
- Vergara, M.A. y Rangel, J.A. 1990. “Biofertilizantes (*Azospirillum spp.*); alternativa nutricional en maíz (*Zea Mays L.*)”. Chapingo. Año XV. Núms. 69-70: 7-9.
- Zaady, E. y Perevolotsky, A. 1995. “Enhancement of growth and establishment of oak seedlings (*Quercus ithaburensis* Decaisne) by inoculation with *Azospirillum brasilense*”. Forest Ecology and Management 72(1): 81-83.

**ANEXO 1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO Y DE TEXTURA
DE LOS SUELOS**

Muestra	pH	Capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE)	Textura
Arrozal # 1	5,05	22,82	Franco
Arrozal # 2	5,21	24,26	Franco arenoso
Arrozal # 3	5,09	25,32	Franco
Arrozal # 4	6,04	36,40	Franco arcilloso
Arrozal # 5	5,36	30,13	Arcilloso
Arrozal # 6	5,14	25,33	Arcilloso
Arrozal # 7	5,15	41,76	Franco arcilloso
Arrozal # 8	5,73	33,97	Franco
Arrozal # 9	5,88	43,85	Franco
Tárcoles	5,77	46,33	Franco arcillo-arenoso

Fuente: Laboratorio de Suelos y Foliare, CIA.

ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Medio libre de nitrógeno con azul de bromotimol (NFb)

Basado en el de Döbereiner *et al.*, 1976; citado por Motsara *et al.*, 1995.

Ácido málico	5 g
KOH	4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	trazas
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
NaCl	0,02 g
CaCl ₂	0,01 g
Na ₂ MoO ₄	0,002 g
Azul de bromotimol (0,5 % m/v en etanol)	2 ml
Biotina	0,1 mg
Agua desionizada	1000 ml

Ajustar el pH a 6,8 - 7,0 (color verde) con NaOH_(ac). Para medio semisólido añadir 2 g de agar. Para medio sólido añadir 20 mg de extracto de levadura y 15 g de agar.

Medio infusión de papa (BMS)

Basado en el de Döbereiner, 1980

Papas	200 g
Ácido málico	2,5 g
KOH	2 g
Azúcar de caña (sacarosa)	2,5 g
Biotina	0,1 mg
Agar	15 g

Cocinar las papas en agua de llave por 30 minutos y luego recoger el caldo. Disolver los 2,5 g de ácido málico en 50 ml de agua, añadir los 2 g de KOH y dos gotas de azul de bromotimol (0,5 %m/v en etanol), posteriormente ajustar el pH con NaOH_(ac) hasta obtener color verde. Añadir esta disolución, el azúcar y la biotina al caldo de papa, diluir hasta 1000 ml con agua desionizada y agregar el agar.

Agar nutritivo (AN)

Receta utilizada en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, CIA

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1000 ml

Para caldo nutritivo no añadir el agar.

ANEXO 3. DISOLUCIÓN NEGRO SUDÁN B (Bradshaw, 1976)

Negro Sudan B	0,3 g
Etanol (95 %)	75 ml

Disolver el negro Sudan B en el etanol. Agregar 25 ml de agua destilada y mezclar bien.