

EMPLEO DEL *Azospirillum* COMO BIOFERTILIZANTE

Madeline Pereira

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba**

En la década del 70, debido a la amplia disponibilidad de fertilizantes nitrogenados, existía desinterés por parte de agricultores, ecólogos y economistas por el proceso de fijación biológica del dinitrógeno atmosférico. La inclusión de este tema desde aquellos años dentro de los objetivos del Programa Biológico Internacional reflejaba una previsión del futuro. Hoy la fijación del dinitrógeno y la actividad fotosintética aparecen como un binomio representativo de lo que la ciencia puede aportar a la solución de la crisis alimentaria y energética.

Probablemente, el nitrógeno sea el factor limitante más común del crecimiento de las plantas y su suministro inadecuado en la agricultura constituye uno de los factores más importantes que contribuyen al hambre humana.

La fijación biológica del dinitrógeno atmosférico es el proceso llevado a cabo por determinados microorganismos del suelo, que permite a este elemento de la biosfera, de gran significación en la ecología de nuestro planeta, encontrarse disponible en el suelo de forma asimilable por las plantas. En la medida en que el hombre pueda hacer más eficiente este proceso, se reduciría no sólo el gasto que representa la fertilización nitrogenada, sino también lo que su abuso lleva consigo.

Tanto para Cuba como para el resto de los países subdesarrollados, poder realizar aplicaciones en este campo de la fijación biológica del dinitrógeno es de especial importancia, lo que se hace aún

mayor si se toma en consideración la baja fertilidad de nuestros suelos ganaderos y que la disponibilidad de fertilizantes para los pastos es prácticamente nula.

Las bacterias del género *Azospirillum* han sido ampliamente estudiadas debido a su efecto nitro fijador y promotor sobre el crecimiento vegetal. Estudios fisiológicos y bioquímicos de esta bacteria diazotrófica se abren paso en la actualidad con la utilización de las herramientas genéticas desarrolladas para este género (Pedrosa, 1988; Matveev, Sen y Panasenkov, 1988; Michiels, Vanderleyden y Van Gool, 1989).

I. Redescubrimiento del Azospirillum

Desde hacía más de dos décadas sólo se hablan encontrado esporádicos informes sobre la fijación simbiótica del dinitrógeno atmosférico asociado a pastos tropicales, pero estos estudios tomaron fuerza a partir del trascendental descubrimiento y desarrollo de la técnica de reducción del acetileno que permitió la determinación de la actividad nitrogenasa, con lo cual quedó demostrado inequívocamente la fijación asimbiótica del dinitrógeno atmosférico en arroz, maíz, millo perla y algunas variedades de pastos tropicales (Von Bülow y Döbereiner, 1975; Smith, Bouton, Schank, Quesenberry, Tyler, Milam, Gaskins y Little, 1976).

La asociación simbiótica entre las leguminosas y los rizobios conforma el sistema más complejo y desarrollado de

fijación biológica del dinitrógeno atmosférico; no obstante, han sido descubiertas otras simbiosis aparentes (aunque bastante lábiles) entre bacterias fijadoras de nitrógeno que viven asociadas a las raíces de ciertas gramíneas tropicales, como *Digitaria decumbens*, donde se encontraron poblaciones de *Spirillum lipoferum*, reconocida como fijadora del dinitrógeno. Estas bacterias no forman estructuras especializadas como los nódulos, simplemente crecen en la superficie de las raíces y en la rizosfera (Döbereiner, 1978).

En el año 1925, Beijerinck (citado por Tarrand, Krieg y Döbereiner, 1978) describió las bacterias aerobias fijadoras del dinitrógeno como *Spirillum lipoferum* y las ubicó en la familia *Spirillaceae*, género *Spirillum*. Este género adquiere actualidad en 1976; desde entonces se han aislado cientos de cepas de numerosos países y los estudios realizados con estas han suministrado

suficientes argumentos para proponer la creación de un nuevo género: *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978).

Hasta el momento han sido clasificadas cuatro especies de este género: *A. lipoferum* (reclasificado por Tarrand *et al.*, 1978); *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978); *A. amazonense* (Magalhaes, Baldani, Souto, Kuykendall y Döbereiner, 1983) y *A. halopraeferans* (Reinhold, Hurek, Fendrik, Pot, Gillis y Deley, 1987). Estas bacterias han sido aisladas de una amplia cantidad de variedades de plantas, incluyendo muchos pastos y cereales de zonas tropicales, templadas y frías de todo el mundo; no obstante, solamente en la rizosfera de algunas plantas tropicales y subtropicales este género es cuantitativamente significativo (Reinhold *et al.*, 1987).

Los resultados que se muestran en la tabla 1 indican que la presencia de *Azospirillum* spp. es predominante en las muestras tomadas del trópico.

Tabla 1. Distribución geográfica de *Azospirillum* spp. En muestras de raíces y suelo colectadas en varios países (Reinhold *et al.*, 1987).

Origen de las muestras	Latitud	Raíces de pastos		Suelo	
		No. de muestras	% muestras positivas	No. de muestras	% muestras positivas
Europa	48-58° N	-	-	48	8
USA	43-47° N	62	11	6	17
Africa	6-15° N	45	58	53	79
Colombia	3° N	54	43	-	-
Brasil tropical	0-23° S	926	61	192	62
Brasil subtropical	30° S	226	22	-	-

II. Fijación biológica del dinitrógeno atmosférico

Sobre cada 100 m² de suelo existen alrededor de 800 000 kg de nitrógeno. A pesar de su abundancia en la atmósfera, rara vez hay en el suelo suficiente cantidad de este elemento en forma de nitrato y sales amónicas como para satisfacer las necesidades de las plantas (Brill, 1977).

Nitrogenasa es el término aplicado al sistema enzimático capaz de fijar N₂; no se trata de una enzima simple, sino de dos componentes proteicos, una proteína Mo-Fe (dinitrogenasa) y otra Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa). Individualmente no se ha conseguido demostrar actividad catalítica en ninguna de las dos proteínas, por lo que es necesaria su unión para que activen la molécula de nitrógeno. El sistema requiere energía, la cual es tomada en forma de ATP, y un fuerte agente reductor para reducir el N₂; el reductor fisiológico es generalmente ferredoxina, aunque en algunos organismos puede funcionar la flavodoxina (Pedrosa, 1988).

La bioquímica de la fijación del dinitrógeno supone la transferencia de átomos de hidrógeno de los glúcidos al nitrógeno. El responsable de la transferencia es el complejo nitrogenasa. Para transferir átomos de hidrógeno hasta un transportador activo de electrones, los protones de núcleos de hidrógeno pueden saltarse y capturarse libremente a través del medio acuoso de la célula (Pedrosa, 1988).

Se ha establecido que para la reacción de reducción del dinitrógeno se necesita la presencia de la nitrogenasa, el ATP, alguna fuente de electrones y el Mg²⁺. Hay que señalar que la nitrogenasa tiene la particularidad de reducir no sólo al nitrógeno molecular, sino a otro sustrato que posee enlaces triples; tal circunstancia ha permitido emplear el método de determinación de la fijación

de dinitrógeno por la reducción del acetileno hasta etileno (Brill, 1977).

En las reacciones de fijación del dinitrógeno es muy importante su sensibilidad frente al oxígeno, hasta el punto que la reacción ocurre solamente en condiciones microaeróbicas. El oxígeno afecta adversamente la actividad nitrogenasa y después de una prolongada exposición a este gas la enzima, especialmente la Fe-proteína, es inactivada de forma irreversible, por lo que cesa la fijación. La Fe-proteína es más sensible al oxígeno que la Mo-Fe proteína. Además, la Fe-proteína de la mayoría de los microorganismos es muy sensible al frío y se inactiva a 0°C (Yagodín, 1986).

Estudios sobre la regulación de la actividad nitrogenasa en *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense*, demostraron que este sistema enzimático *in vivo* es inactivado por adición de concentraciones elevadas de NH₄ o glutamina (Pedrosa y Yates, 1983; Hartmann, Fu y Burris, 1986).

Dentro de los diazótrofos de la rizosfera, *A. brasilense* se ha considerado un modelo genético para el estudio del control de la fijación biológica del dinitrógeno. Se ha demostrado que la regulación de la expresión de los genes *nif* es el mecanismo clave en el control de este proceso (Pedrosa *et al.*, 1983; Pedrosa y Yates, 1984; Fogher, Bozouklian, Dandhari y Elmerich, 1985).

Estudios de clonaje de los genes *nif* (Quiviger, Franche, Lutfalla, Haselkorn y Elmerich, 1982; Fahsold, Sing y Klingmuller, 1985), *gin A* (Bozouklian y Elmerich, 1986), *his* (Fani, Bazzicalupo, Gallori, Turbanti y Polsinelli, 1985), endonucleasas de restricción (Schwabe y Klingmuller, 1985) y el aislamiento de mutantes *nif* específicos, permitieron finalmente dilucidar el mecanismo regulador de la expresión de estos genes (Pedrosa, 1988).

III. Características del género

El género *Azospirillum* (del francés *Azote*, nitrógeno y del griego *Spirillum*, pequeña espiral) se caracteriza, según Tarrand *et al.* (1978), por presentar células generalmente vibrioides, en forma de C o pleomórfica en medio semisólido de malato libre de nitrógeno + 0,005% extracto de levadura; su tamaño es de aproximadamente 1 µm de diámetro y 2,1-1,8 µm de longitud.

Son mótils en medio líquido, con un flagelo polar; en medio sólido a 30°C presentan numerosos flagelos laterales en adición al flagelo polar. Contienen prominentes gránulos intracelulares de β-polihidroxibutirato (Tarrand *et al.*, 1978; Sadasivan y Neyra, 1987).

Poseen principalmente un tipo de metabolismo respiratorio, pero también pueden presentar alguna capacidad fermentativa. Bajo severas condiciones de limitación de oxígeno el nitrato es reducido a nitrito, óxido nitroso o nitrógeno gaseoso (Tarrand *et al.*, 1978).

Son oxidasa-positivas y crecen bien en sales de ácidos orgánicos tales como malato, succinato, piruvato o lactato. Algunos carbohidratos pueden ser también usados como fuente de carbono, pero existen especificidades en cuanto a la ruta metabólica empleada en la degradación de los mismos (tabla 2). Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 35 y 37°C. El por ciento molecular de G + C del DNA es aproximadamente de 70, por los métodos de desnaturalización termal (Amaresh y Mishra, 1984).

Tabla 2. Rutas empleadas por *Azospirillum* spp. para el metabolismo de carbohidratos.

	Fuente carbonada				Referencias
	D-Gluconato	D-Glucosa	D-Fructosa	Sacarosa	
<i>A. lipoferum</i>	ED	EMP ED	EMP ED	(-)	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>A. brasilense</i>	ED	(-)	EMP	(-)	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>A. amazonense</i>	ND	ED	ED	ED	Magalhaes <i>et al.</i> , 1983
<i>A. halopraeferans</i>	ND	ND	ND	(-)	Reinhold <i>et al.</i> , 1987

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas o vía glucolítica
(-): No crecimiento

ED: Vía Entner-Doudoroff
ND: No determinada

Pueden fijar el dinitrógeno atmosférico tanto en condiciones de vida libre como en asociación con hierbas, pero en todos los casos bajo condiciones estrictas de microaerofilia (Elmerich, Bozouklian, Vieille, Fogher, Perroud, Perrin y Vanderleyden, 1987).

Azospirillum posee la capacidad de sintetizar la enzima hidrogenasa (Pedrosa y Yates, 1982), la cual es responsable del proceso de reciclaje del hidrógeno producido por la enzima nitrógenasa (Pedrosa, 1988).

La presencia de la enzima hidrogenasa en las bacterias nitrificadoras implica:

- a) Protección de la enzima nitrogenasa contra la inactivación por oxígeno.
- b) Prevención de la inhibición de la reducción del dinitrógeno por el hidrógeno.
- c) Recuperación por fosforilación oxidativa de la energía perdida con la formación de hidrógeno (H_2) por la enzima hidrogenasa, lo que implica pérdida de energía que no puede ser utilizada en la síntesis de NH_3 según Dixón (citado por Pedrosa, 1988).

La mayoría de los investigadores plantean que aparentemente las especies muestran un considerable grado de especificidad en su capacidad de infectar las raíces (Baldani y Döbereiner, 1980). De ahí que *A. lipoferum* presente afinidad con las plantas de tipo C-4, tales como hierbas tropicales (*Panicum*, *Cynodon*, *Pennisetum*, *Digitaria*, etc.) y otras como maíz y sorgo; mientras que *A. brasilense* muestra afinidad con las plantas de tipo C-3, tales como trigo, avena y arroz. La caña de azúcar constituye una excepción, porque aunque es una especie C-4, *A. brasilense* presenta con ella su mayor afinidad (Mandimba, Heulin, Bally, Guckert y Balandreau, 1986).

IV. Simbiosis asociativa

Estos microorganismos fijan el dinitrógeno atmosférico utilizando como sustrato las sustancias nutritivas exudadas por la raíz de las plantas correspondientes. Si bien el sistema radical de todas las plantas libera aminoácidos, vitaminas, azúcares y otros metabolitos en mayor o menor cantidad, el exudado radical de las plantas C3 y C4 es particularmente rico y abundante en determinados compuestos orgánicos, lo que permite la implantación y desarrollo

de los microorganismos que le son beneficiosos (Mandimba *et al.*, 1986).

Azospirillum no forma estructuras morfológicas especiales, a lo sumo penetra ligeramente en la lámina media de las células corticales y puede fijar N_2 cuando crece en ausencia de la planta. Por ello, la asociación que forman no es una auténtica simbiosis mutualista, sino una simbiosis asociativa o rizocenosis diazotrófica (Bedmar y Olivares, 1982).

V. Efectos de la inoculación con *Azospirillum*

El efecto beneficioso que producen estos microorganismos sobre las plantas, ya sea de tipo hormonal o nitrificador, puede estar influenciado por múltiples factores, como son:

1. La cantidad de sustratos carbonados disponibles en la raíz o la rizosfera.
2. La proporción de dichos sustratos, que debe ser asequible a los microorganismos nitrificadores.
3. Eficiencia con que estas bacterias utilizan los sustratos para la fijación del dinitrógeno.
4. La disponibilidad de este dinitrógeno fijado para la planta.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la manipulación de *Azospirillum* como biofertilizante son los factores que pueden afectar directamente la eficiencia del proceso de fijación del dinitrógeno. Dentro de ellos se encuentran las tensiones de oxígeno disuelto, la ruta metabólica empleada en la degradación de sustratos carbonados, la temperatura, el pH, la eficiencia en la síntesis de ATP, la relación *in vitro* de proteínas nitrogenasas (Mo-Fe/Fe-proteína), la disponibilidad de Fe, S, N, P y Mo, el alcance de los requerimientos para mantener el nivel energético, la tasa de crecimiento y la presencia de la enzima hidrogenasa (Andersen y Shanmugan, 1977; Yates, Walder, Partridge, Pedrosa, Stephan y Döbereiner, 1981; Michiels *et al.*, 1989).

Estudios realizados han demostrado que *A. brasilense* sp. 7 (ATCC 29145) es capaz de fijar el dinitrógeno en condiciones de vida libre (Okon, Albrecht y Burris, 1976) y con tejidos de callos de plantas. Cultivos de callos de caña de azúcar no solo sobrevivieron y mantuvieron considerable actividad del complejo nitrogenasa, sino que continuaron un lento crecimiento en presencia de *A. brasilense* sp. 7 por más de 18 meses en un medio sin nitrógeno. Igualmente, las bacterias presentaron un gran crecimiento sobre los tejidos del callo o en sus espacios intracelulares. El continuo crecimiento de estos microorganismos muestra que son capaces de obtener y utilizar los metabolitos producidos por los tejidos de los callos. Se ha sugerido que los callos excretan al medio ácidos orgánicos que son utilizados por las bacterias (Child y Kurz, 1978).

La inoculación de *Pennisetum americanum* con *A. brasilense* incrementó grandemente la proliferación de pelos radicales y produjo incrementos significativos en el peso de las raíces, sin expresión alguna del complejo enzimático nitrogenasa. Se detectó que esta bacteria es capaz de producir giberelinas y citoquininas, ambas hormonas estimulantes del crecimiento y desarrollo vegetal (Triend Gasrins y Hubell, 1979).

Martín y Albrecht (1981) realizaron un estudio detallado del sistema radical de hierbas inoculadas con *A. brasilense* y *A. lipoferum* y obtuvieron un aumento significativo de su radio; ellos plantearon que esto es un efecto probable de la producción de hormonas por *Azospirillum*, lo que se vio corroborado con el desarrollo de pelos radicales mucho más densos en presencia de esta bacteria que en su ausencia.

Trabajos de inoculación realizados en gramíneas demuestran que en determinadas asociaciones con *Azospirillum*

pirillum spp., el mayor efecto de la inoculación es una estimulación hormonal del crecimiento de la raíz y esto conlleva a un notable incremento en la adquisición de nutrimentos a través de una mayor explotación del suelo (Vose, 1983).

Se plantea que la bacteria *Azospirillum* puede actuar sobre las plantas de varias formas; el N_2 atmosférico que ha sido fijado queda a disposición de la planta y la absorción de los iones minerales tales como NO_3^- , K^+ y $H_2PO_4^-$ se ve estimulada por el desarrollo notable del sistema radical, lo cual está estrechamente relacionado con la producción de citoquininas y giberelinas por este microorganismo (Anderson, 1985). También ha sido demostrado que las especies de esta bacteria producen auxinas cuando se les suministra triptófano (Horemans, De Conick, Neuray, Hermans y Vlassak, 1986; Zimmer, Roeben y Bhote, 1988).

Muchos científicos consideran que la inoculación con *Azospirillum* spp. es un importante medio para incrementar los rendimientos de los cultivos en condiciones donde la suplementación del nitrógeno mineral no sea un problema mayor. También se plantea que la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento por estos microorganismos parece ser más relevante que la actividad nitrofixadora (Vlassak y Reynder, citados por Vose, 1983).

Resultados obtenidos por Okon, Albrecht y Burris (1977) en varios experimentos de campo, al inocular *Zea mays* con *A. lipoferum* bajo condiciones de riego y diferentes niveles de fertilización nitrogenada, mostraron incrementos significativos en los rendimientos. Igual comportamiento, tanto en el rendimiento de materia seca como en el contenido de nitrógeno, ha sido obtenido para esta misma planta y para *Setaria italica* al ser inoculada con *A.*

brasiliense en condiciones de campo y en ausencia de riego y fertilización nitrogenada (Kapulnik, 1981).

La inoculación de *Panicum maximum* y *Digitaria decumbens* con *A. brasiliense*, ha permitido obtener aumentos en los rendimientos de materia seca ascendentes a 80 y 61% respectivamente, así como valores de fijación de nitrógeno equivalentes a 28–68 kg de N/ha/año (según Weier, citado por Martínez, Herrera e Iglesias, 1984).

En campos comerciales de Israel se realizó un estudio del efecto de la inoculación con *A. brasiliense* en 6 gramíneas en condiciones de invernadero (tabla 3) y en todos los casos se obtuvo incrementos significativos en el rendimiento y el contenido total de nitrógeno (Okon, 1982).

La tabla 4 muestra los incrementos significativos obtenidos en el rendimiento de materia seca para varias gramíneas inoculadas con *A. brasiliense*, utilizando

diferentes niveles de fertilización nitrogenada.

Malik y Zafar (1985) obtuvieron resultados significativos en la fijación del dinitrógeno atmosférico al estudiar una asociación de *A. halopraeferans* con Kallar grass (*Leptochloa fusca*) en suelos salinos y básicos de Pakistán; la fijación de N₂ fue cuantificada mediante el empleo de técnicas con ¹⁵N y el balance de N. Otros investigadores, auxiliándose también de estas mismas técnicas, han obtenido buenos resultados en la fijación de N₂ para cultivos como el arroz, la caña y algunos pastos inoculados con *Azospirillum* spp. (App, Watanabe, Ventura, Bravo y Jurey, 1986; Lima, Boddey y Döbereiner, 1987).

Incrementos significativos en los rendimientos de algunos pastos y cereales inoculados con *Azospirillum* spp. fueron obtenidos por Wani (1990) al realizar un estudio del efecto de la inoculación sobre estas plantas en suelos de Israel. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 3. Efecto de la inoculación con *A. brasiliense* cepa CD en el peso seco y contenido de nitrógeno en 6 gramíneas (Okon, 1982).

Especie de gramínea	Peso seco (g)	% N	Contenido total
			de nitrógeno (mg)
<i>Zea mays</i> cv. Jubilee	C 2,93	0,71	20,8
	I 3,58	0,75	26,8
<i>Setaria italica</i>	C 1,58	0,91	14,0
	I 2,82	1,13	32,0
<i>Sorghum bicolor</i> cv. Hazera 226	C 1,70	1,64	28,0
	I 2,70	2,14	57,1
<i>Panicum miliaceum</i>	C 0,59	1,95	11,0
	I 0,95	1,85	17,9
<i>Sorghum bicolor</i> × <i>S. sudanense</i>	C 1,30	1,83	27,4
	I 1,78	2,28	40,5

I Inóculo ~ 10⁸ cel/ml

C control = medio de cultivo estéril

Tabla 4. Efecto de la inoculación con *A. brasilense* en varias gramíneas.

Gramínea	Fertilizante nitrogenado (kg/ha)	Incremento en el rendimiento de MS (kg/ha)	Referencias
P. maximum	I + 30	2 090	Smith et al., 1976
	I + 20	1 021	" " " "
Shorgum	I + 40	1 310	" " " "
Cenchrus ciliaris	I + 40	548	Smith, Schank, Milan y Beltensperger (1984)

Tabla 5. Resultados obtenidos en Israel al inocular con *Azospirillum* spp. (Wani, 1990).

Especie	No. de experimentos	Incrementos en el rendimiento (%)	No. de experimentos con incrementos significativos	Incremento mayor de 5 %
Maíz	13	16	7	11
Trigo (forrajero y grano)	10	9	5	8
Sorgo (forrajero y grano)	5	17	5	5
Setaria italica	2	43	2	2
Panicum miliaceum	1	13	1	1

En Cuba se aisló por primera vez la bacteria *Azospirillum* fijadora de N en asociación con raíces de *Digitaria decumbens*, donde se identificaron formas de *Spirillum* responsables de la fijación en las zonas radicales de algunas gramíneas. Esta capacidad nitrofixadora se demostró por la presencia de la actividad nitrogenasa en las raíces y mediante la incorporación de nitrógeno al tejido vegetal (Martínez Viera *et al.*, 1984).

También se han realizado aislamientos de *Azospirillum* spp. de raíces de guinea en suelo Pardo con Carbonates y Ferralítico Rojo

(Hernández, Sistachs, Cruz y Sarmiento, 1990; Pereira, Madeline; Rodríguez, Orlando y Gazó, Magalys, inédito), king grass, sorgo, caña de azúcar, brachiaria y rhodes en suelo Ferralítico Rojo (Hernández y Prieto, 1992; González, Cruz, Pérez, Pérez y Vázquez, 1992; Pereira, Madeline *et al.*, inédito).

En un estudio con cuatro cepas de *Azospirillum* spp. asociadas a king grass en condiciones de invernadero sobre suelo Ferralítico Rojo, se reflejaron incrementos notables en el peso de las raíces y la masa verde para esta especie (Vázquez y Gonzáles, 1990); estas mismas cepas fueron estudiadas en

condiciones de campo y sobre el mismo tipo de suelo y se obtuvieron nuevamente incrementos en los rendimientos. Los valores oscilaron entre un 50 y 100% de las plantas inoculadas con respecto al testigo.

Hernández *et al.* (1992) estudiaron el efecto de tres cepas de *Azospirillum* sobre el comportamiento agronómico de *Shorgum* en suelos Ferralíticos Rojos de la provincia de La Habana y obtuvieron incrementos significativos para el rendimiento de materia verde, materia seca y contenido de nitrógeno con respecto al control sin inocular. Resultados similares fueron obtenidos al inocular 2 gramíneas tropicales (*P. maximum* cv. Likoni y *Chloris gayana* cv. Callide) con 5 cepas de *Azospirillum* spp. en condiciones de invernadero sobre suelo Ferralítico Rojo de la provincia de Matanzas (Pereira, Madeline *et al.*, inédito).

CONCLUSIONES

El crecimiento de las plantas promovido por la asociación de la bacteria *Azospirillum* con el sistema radical, es un fenómeno de considerable interés económico y científico. El empleo de este microorganismo como biofertilizante, además de significar un consecuente ahorro de recursos, tiene muchos aspectos positivos, dentro de los que se puede señalar el de no ocasionar desbalances en el ecosistema por incrementos de los niveles de toxicidad característicos de los fertilizantes químicos utilizados a gran escala en la agricultura.

Esta bacteria estimula el crecimiento de las plantas y el desarrollo de las raíces por su característica de producir sustancias hormonales estimulantes del crecimiento vegetal. Ello resulta de significativa importancia para las plantas, porque permite el aumento de su capacidad absorptiva para los nutrientes

del suelo y las hace más resistentes a las condiciones de estrés hídrico.

Dichos microorganismos son capaces de utilizar gran variedad de compuestos orgánicos como fuente energética, así como de desarrollar vías alternativas en el metabolismo de los mismos, lo que hasta cierto punto favorece su supervivencia en el suelo. Pueden fijar entre 20 y 60 kg N/ha/año, aunque se han informado valores superiores a los 67 kg N/ha/año para algunos pastos inoculados con cepas específicas y en determinados tipos de suelos.

La actividad nitrificadora de *Azospirillum* es notoria y capaz de contribuir significativamente al incremento de los rendimientos en las plantas cuando en el suelo la suplementación del nitrógeno mineral no sea deficiente; por este motivo, muchos experimentos se desarrollan utilizando una fertilización nitrogenada basal, lo que se ha convertido en una tendencia mundial.

Se considera que un estudio profundo de selección de cepas eficientes para gramíneas promisorias y determinados cultivos, específicamente en diferentes tipos de suelos de nuestro país, permitirá explotar al mismo nivel y con eficiencia el potencial nitrificante de esta bacteria y su capacidad de producir hormonas estimulantes del crecimiento y desarrollo vegetal.

CONCLUSIONS

The growth of plants promoted by the root system and *Azospirillum* bacteria association has acquired a considerable interest of scientific and economical importance. The use of this microorganism as biofertilizer has many positive aspects without taking into consideration the consequent saving of resources. One the positive aspects is the possible use of this microorganism without causing ecosystem unbalances due to increments of toxic levels which is

something evident in chemical fertilizers widely used in agriculture.

This bacterium stimulates plant growth and root development as it is able to produce hormonal stimulating substances for plant growing. This is of great importance for the plants as they are able to increase their soil absorbing capacity for nutrients and their resistance against water stress.

These microorganisms are able to utilize a great quantity of organic compounds as energetic source and they are able to develop alternative forms in their metabolism and this; of course, may enhance their survival in the soil. They may fix at about 20-60 kg of N/ha/year although values higher than 67 kg of N/ha/year in some grasses inoculated with specific strains under certain soil conditions, has been informed.

The N fixing activity of *Azospirillum* may be noticed and may contribute significantly to the increment of plant yields when the mineral nitrogen of the soil is not deficient; for that reason, many experiments are conducted using a basal N fertilization as a world using tendency.

It is considered that the profound study of efficient strain selection for promisory grasses and certain crops under our soil conditions will permit the exploitation of the nitrogen fixing potential of this bacterium at the same level and with efficiency as well as its ability for producing hormonal stimulating substances for plant growing.

REFERENCIAS

- AMARESH, D. & MISHRA, A.K. 1984. *Indian Journal of Experimental Biology*. 22:536
- ANDERSEN, K. & SHANMUGAN, K.T. 1977. *J. Gen. Microbiol.* 103:107
- ANDERSON, I.G. 1985. *South African Sugar Journal*. 69:450
- APP, A.A.; WATANABE, I.; VENTURA T.S.; BRAVO, M. & JUREY, C.D. 1986. *Soil Sci.* 141:448
- BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. 1980. *Soil Biol. Biochem.* 12:433
- BEDMAR, E.J. & OLIVARES, J. 1982. *Investigación y Ciencia*. Febrero, p. 20
- BOZOUKLIAN, H. & ELMERICH, C. 1986. *Biochimie*. 68:1181
- BRILL, W.J. 1977. *Investigación y Ciencia*. Mayo, p. 44
- CHILD, J.J. & KURZ, W.G.W. 1978. *Can. J. Microbiol.* 24:143
- DAY, J.M. 1976. Associative symbiosis and free-living systems. In: Proc. 1st Int. Symp. on Nitrogen Fixation. (W.E. Newton and C.J. Nyman, Eds.). Washington State University Press, Pullman
- DOBEREINER, J. 1978. *Educ.-Ecol. Bull.* (Stockholm) 26:343
- ELMERICH, C.; BOZOUKLIAN, H.; VIEILLE, C.; FOGHER, C.; PERROUD, B.; PERRIN, A. & VANDERLEYDEN, J. 1987. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 317, p. 183
- FAHSOLD, R.; SINGH, M. & KLINGMULLER, W. 1985. Cosmid cloning of nitrogenase structural genes of *Azospirillum lipoferum*. In: *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology. (Klingmuller, W., Ed.). Springer Verlag, Berlin. p. 30
- FANI, R.; BAZZICALUPO, M.; GALLORI, E.; TURBANTI, L. & POLSINELLI, M. 1985. Construction of a gene bank of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology. (Klingmuller, W., Ed.). Springer-Verlag, Berlin. p. 1
- FOGHER, C.; BOZOUKLIAN, H.; BANDHARI, S.K. & ELMERICH, C. 1985. Construction of a genomic library of *Azospirillum brasilense* Sp7 and cloning of the glutamine synthetase gene. In: *Azospirillum* III. Genetics, Physiology, Ecology. (Klingmuller, W., Ed.). Springer-Verlag, Berlin. p. 41
- GONZALES, F.; CRUZ, MARÍA E.; PÉREZ, MARLEN; PÉREZ, JUANA & VÁZQUEZ, MAYDA. 1992. Resultados

- preliminares en la utilización de biofertilizantes en gramíneas. Resúmenes IX Seminario Científico Nacional y I Hispanoamericano de la EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 164
- HARTMANN, A.; FU, H. & BURRIS, R. 1986. **J. Bacteriol.** 165:864
- HERNÁNDEZ, YOLANDA & PRIETO, A. 1992. Resultados parciales sobre la inoculación con *Azospirillum* en Sorgo. Resúmenes IX Seminario Científico Nacional y I Hispanoamericano de la EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 163
- HERNÁNDEZ, YOLANDA; SISTACHS, E.; CRUZ, ANA M. & SARMIENTO, MARIELA. 1990. Caracterización de cepas de *Azospirillum* en gramíneas. Resúmenes III Seminario Nacional Científico Técnico de Pastos y Forrajes. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 134
- HOREMANS, S.; DE CONICK, K.; NEURAY, J.; HERMANS, R. & VLASSAK, K. 1986. **Symbiosis**. 2:341
- KAPULNIK, Y. 1981. **Plant and Soil**. 61:65
- LIMA, E.; BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. 1987. **Can. J. Microbiol.** 29:1036
- MAGALHAES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J. 1983. **Academia Brasileira de Ciencias. Anais**. 55:417
- MALIK, K.A. & ZAFAR, Y. 1985. Quantification of root associated nitrogen fixation in Kallar grass as estimated by ¹⁵N isotope dilution. In: Proc. Int. Symp. Nitrogen and the Environment. (Malik, K.A. et al., Eds.). Nuclear Institute for Agriculture and Biology. Faisalabad, Pakistan, p. 161
- MANDIMBA, G.; HEULIN, T.; BALLY, R.; GUCKERT, A. & BALANDREAU, J. 1986. **Plant and Soil**. 90:129
- MARTIN, P. & ALBRECHT, P. 1981. Mutual influences of *Azospirillum* spp. and grass seedlings. In: *Azospirillum*. Genetics, Physiology, Ecology. Workshop held at the University of Bayreuth, Germany. p. 16
- MARTÍNEZ, R.; HERRERA, ALEYDA & IGLESIAS, MAYDA. 1984. **Ciencias de la Agricultura**. 21:3
- MATVEEV, V.YU; SEN, A.N. & PANASENKO, V.I. 1988. **Folia Microbiol.** 33:273
- MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J. & VAN GOOL, A. 1989. **Biol. Fertil. Soils**. 8:356
- OKON, Y. 1982. Phosphorus in Agriculture. No. 82
- OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. 1976. **J. Bacteriol.** 127:1248
- OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. 1977. **Appl. Environ. Microbiol.** 33:85
- PEDROSA, F.O. 1988. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**. 6:345
- PEDROSA, F.O. & YATES, M.G. 1982. **J. Gen. Microbiol.** 128:161
- PEDROSA, F.O. & YATES, M.E. 1983. Nif mutants of *Azospirillum brasilense*: evidence for a nifA type regulation. In: *Azospirillum* II: Genetics, Physiology, Ecology. (Klingmuller, W., Ed.). Birkhauser, Basel. p. 66
- PEDROSA, F.O. & YATES, M.G. 1984. **FEMS. Microbiology Letters**. 23:95
- QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G.; HASELKORN, R. & ELMERICH, C. 1982. **Biochemie**. 64:495
- REINHOLD, B. & HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M. & DELEY, J. 1987. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 37:43
- SADASIVAN, L. & NEYRA, C.A. 1987. **J. Bacteriol.** 169:1670
- SCHWABE, G. & KLINGMULLER, W. 1985. Cloning of the gene for restriction enzyme Abr 1 from *Azospirillum brasilense* ATCC 297. In: *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology. (Klingmuller, W., Ed.). Springer-Verlag, Berlin. p. 52
- SMITH, R.L.; BOUTON, J.H.; SCHANK, S.C.; QUESENBERRY, K.H.; TYLER, M.E.; MILAM, J.R.; GASKINS, M.H. & LITTLE, R.C. 1976. **Science**. 193:1003
- SMITH, R.L.; SCHANK, S.C.; MILAM, J.R. & BELTENSBERGER, A.A. 1984. **Appl. Environ. Microbiol.** 47:1331
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DÖBEREINER, J. 1978. **Can. J. Microbiol.** 24:967
- TIEND, T.M.; GASRINS, M.H. & HUBELL, D.H. 1979. **Appl. Environ. Microbiol.** 87:1016
- VÁZQUEZ, MAYDA & GONZÁLEZ, F. 1990. Evaluación de cepas de bacterias

- fijadoras de nitrógeno aisladas en gramíneas. Resúmenes VIII Seminario Nacional Científico Técnico de Pastos y Forrajes. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 135
- VON BULOW J.F.W. & DÖBEREINER, J. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 72:2389
- VOSE, B.P. 1983. *Can. J. Microbiol.* 29:837
- WANI, S.P. 1990. *Indian J. Microbiol.* 30:363
- YAGODIN, B.A. 1986. Agroquímica. Editorial MIR, Moscú. Tomo I
- YATES, M.G.; WALDER, C.C.; PARTRIDGE, C.D.P.; PEDROSA, F.O.; STHEPAN, M.P. & DÖBEREINER, J. 1981. H₂ metabolism and nitrogenase activity in *Azotobacter chroococcum* and *A. brasilense*. In: Current perspective in nitrogen fixation. (Gibson, A.G. and Newton, W.E., Eds.). Australian Academy of Sciences, Canberra, p. 97
- ZIMMER, W.; ROEBEN, K. & BHOTE, H. 1988. The interactions between the N₂ fixing bacterium *Azospirillum* and wheat. In: Nitrogen fixation: Hundred Years After. (Bothe, H. and Newton, W., Eds.). Proc. 7th Int. Congr. on Nitrogen Fixation. Fischer, Stuttgart, New York. p. 776

Recibido el 30 de septiembre de 1992