

Posible efecto fitohormonal de la bacterias fijadoras de nitrógeno

T. Hernández*

C. García*

J. A. Pascual*

M^a M. Hernández**



En las últimas décadas se ha desarrollado un creciente interés por el conocimiento y aislamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno y por el estudio de su efecto sobre el crecimiento vegetal. El empleo de la "biofertilización nitrogenada" como alternativa de los fertilizantes minerales tradicionales, permitirá disminuir el riesgo de contaminación derivado de los aportes nitrogenados inorgánicos, contribuyendo al establecimiento de metodologías no contaminantes acordes con una **agricultura ecológica**. Así, mientras que los fertilizantes nitrogenados inorgánicos aplicados al suelo se pierden en gran parte por procesos naturales de lixiviación, con riesgo de contaminación de aguas subterráneas, lagos y ríos, causando daños ecológicos graves, con el empleo de biofertilizantes nitrogenados se consigue que nitrógeno fijado en el suelo por las bacterias se encuentre disponible justo en el lugar donde es requerido por la planta (ri-

zosfera), evitándose las pérdidas por lixiviación.

Dado el efecto estimulador sobre el desarrollo de los cultivos ejercido por las bacterias fijadoras de nitrógeno, se ha pretendido potenciar este efecto mediante inóculos bacterianos que aumenten el número de estos microorganismos en el medio de cultivo. Son numerosos los experimentos, tanto de campo como de laboratorio, realizados en este sentido, así como los productos comerciales que han aparecido en el mercado. Sin embargo, dada la complejidad de factores que afectan tanto a la pervivencia y desarrollo de los microorganismos en sistemas naturales como a su actividad, los resultados obtenidos en estos estudios han sido muy variados y a veces contradictorios.

Diferentes experimentos han puesto de manifiesto que la inoculación de semillas de trigo con bacterias fijadoras de nitrógeno produce un incremento en el rendi-

miento de grano y en la cantidad total de nitrógeno (Baldani et al., 1987; Millet and Fieldman, 1984). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual las bacterias fijadoras de nitrógeno contribuyen a la mejora del desarrollo de las plantas y a su producción es todavía desconocido.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter*, *Rizobium* y *Azospirillum* han sido las más empleadas en agricultura como biofertilizantes y existe cada vez una mayor evidencia de que, aparte de la posible fijación de nitrógeno, el efecto positivo de estas bacterias sobre la longitud, número, y área superficial de las raíces es debido a la secreción por las mismas de sustancias estimuladoras del crecimiento (fitohormonas), tales como auxinas, giberelinas y compuestos fenólicos (Murty y Ladha, 1988; Ocón y Kapulnik, 1986). En la mayoría de las especies vegetales estudiadas la colonización tiene lugar en la zona de elongación de las raíces, estimulando la densidad y longitud de los pelos radiculares. Los efectos producidos sobre su morfología y fisiología determinan una mayor absorción de agua y nutrientes, dando lugar a un mayor crecimiento vegetal.

Ocón y Labandera-González (1994) han indicado que *Azospirillum* estimula la densidad y longitud de los pelos radiculares, así como el crecimiento de raíces secundarias y la superficie radicular. La intensidad de estos efectos sobre la raíz depende de la especie vegetal y del cultivar empleado, y sobre todo de la concentración de inóculo en el medio. En la mayoría de los casos la concentración óptima es de 107 unidades formadoras de colonias (UFC) por semilla o plántula. Según estos autores, este microorganismo influye en la concentración de ácido indol acético y de ácido indol-3-butírico, así como en la velocidad de la respiración específica y en la actividad de enzimas relacionados con el ciclo de ácidos tricarbónicos, y también en la ruta de la glicólisis en las raíces de maíz y de otras plantas.

* Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC)

** AGRIMOR

Tabla 1. Tratamientos aplicados en el experimento de Germinación

Tratamientos	Agua, ml/placa	Volumen de biofertilizante nitrogenado (Azobac), ml/placa y cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter + Azospirillum), UFC aplicada con él
Control	10	0
D-1	10	0,0015 ml ($1,5 \times 10^2$ UFC)
D-2	10	0,006 ml (6×10^2 UFC)
D-3	10	0,015 ml ($1,5 \times 10^3$ UFC)
D-4	9,9	0,1ml (1×10^4 UFC)
D-5	9,7	0,3 ml (3×10^4 UFC)
D-6	9,5	0,5ml (5×10^4 UFC)
D-7	9	1ml (1×10^5 UFC)
D-8	8	2ml (2×10^5 UFC)
D-9	7	3 ml (3×10^5 UFC)
D-10	5	5 ml (5×10^5 UFC)
D-11	2	8 ml (8×10^5 UFC)
D-12	0	10 ml (10^6 UFC)

Por todo lo expuesto, hemos llevado a cabo un experimento de germinación en placas Petri, sobre un soporte inerte como la perlita, con el fin de determinar el posible efecto fitohormonal que las bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter* y *Azospirillum*), contenidas en un biofertilizante comercial, AZOBAC, ejercen sobre el crecimiento radicular. Si consideramos que la semilla contiene los elementos nutritivos necesarios para el desarrollo de la plántula en sus primeros estadios, los posibles efectos positivos observados sobre la elongación de raíces o tallos, deben ser atribuidos a sustancias de tipo fitohormonal, estimuladoras del crecimiento. Asimismo, hemos realizado un ensayo de crecimiento de secciones de coleóptilo de avena a fin de comprobar si este efecto fitohormonal es, entre otros, de tipo auxina.

Experimento de germinación en placas Petri

En placas Petri conteniendo 6g de perlita se pusieron, 10 semillas de cebada, añadiendo a continuación a todas las placas (incluidas las placas control) 5 ml de una disolución nutritiva apropiada para el crecimiento del inóculo bacteriano a aplicar, y 10 ml de una disolución conteniendo el correspondiente tratamiento (diferentes concentraciones de la mezcla de bacterias fijadoras de nitrógeno, *Azotobacter* + *Azospirillum*, contenida en el biofertilizante comercial AZOBAC). Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y en ellos la concentración de inóculo aplicada oscilaba entre 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/placa (10 ml de Azobac) en la dosis más elevada (D-12), y $1,5 \times 10^2$ UFC/placa (0,0015 ml de Azobac) en la dosis más baja (D-1). Los tratamientos aplicados se muestran en la **Tabla 1**.

Todas las placas se incubaron

en oscuridad a 28° C durante 5 días en una cámara de incubación, determinándose a continuación el número de semillas germinadas y la longitud de tallos y raíces.

Como puede observarse en la **Figura 1**, todos los tratamientos comprendidos entre $1,5 \times 10^2$ y 3×10^4 UFC de bacterias fijadoras de nitrógeno (0,0015 ml y 0,3 ml del biofertilizante Azobac) mostraban un efecto positivo sobre el crecimiento de la raíz, y los comprendidos entre $1,5 \times 10^2$ y 10^5 UFC (0015 y 1 ml de Azobac) favorecían también el desarrollo del tallo.

Los tratamientos con dosis elevadas de inóculo bacteriano (D-10: 5×10^5 UFC; D-11: 8×10^5 UFC, y D-12: 10^6 UFC) inhibían completamente la germinación de las semillas de cebada. Este efecto inhi-

bido de la germinación no se debe atribuir a la población bacteriana inoculada sino al medio en que ésta se encuentra, rico en ácido butírico producido por los propios microorganismos, el cual tiene un efecto negativo sobre la germinación.

Los tratamientos D-8 (2×10^5 UFC) y D-9 (3×10^5 UFC) producían una inhibición parcial de la germinación, así como una menor elongación del tallo y de las raíces de las plántulas en aquellas semillas que llegaban a germinar, lo cual puede ser debido, al menos en parte, al propio retardo producido en la

germinación.

En el caso de la elongación de las raíces, se aprecia claramente (**Figura 1**) que la respuesta a la dosis se presenta una tendencia a seguir una curva de Gauss, incrementando la elongación con la disminución de la dosis de inóculo hasta un determinado valor de ésta (dosis D-2: 6×10^2 UFC), disminuyendo este efecto positivo en la dosis siguiente (D-1: $1,5 \times 10^2$ UFC). Este tipo de comportamiento es típico de las hormonas, las cuales ejercen un efecto positivo dentro de un determinado rango de concentración, el cual desaparece por encima o por debajo de dicho rango, llegando a ejercer incluso, un efecto inhibitor fuera de estos límites.

En el caso del tallo, la respuesta del crecimiento a la dosis de inóculo era menos gradual, pero también se observaba esta tendencia a seguir una curva de Gauss, apreciándose un menor efecto de las dosis D-1 ($1,5 \times 10^2$ UFC) y D-7 (1×10^5 UFC) con relación a las dosis de D-2 (6×10^2 UFC) a D-6 (5×10^4 UFC); el tratamiento con la dosis D-2 (6×10^2 UFC), al igual que ocurría en el caso de las raíces, era el que daba lugar a los mayores valores de elongación de tallo.

Índice de Germinación

El índice de germinación (IG) es un parámetro que engloba el efecto de un determinado tratamiento so-

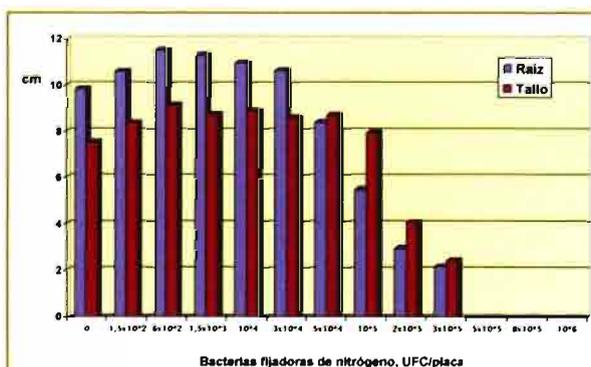


Figura 1. Longitud media de las raíces y tallos de las plántulas de las semillas de cebada germinadas sobre perlita tratada con diferentes concentraciones de inóculo bacteriano

bre la germinación de semilla y sobre el crecimiento de raíz en la plántula germinada y viene dado por la fórmula:

$$IG = \%G Li/L_0$$

donde:

%G, es el porcentaje de semillas germinadas en el tratamiento con respecto al control

L_1 , es la longitud media de las raíces de las plántulas germinadas en las placas con tratamiento

L_0 , es la longitud media de las raíces de las plántulas germinadas en las placas control.

Los tratamientos con dosis comprendidas entre $1,5 \times 10^2$ UFC (0,0015 ml de Azobac) y 3×10^4 UFC (0,3 ml de Azobac) presentaban un índice de germinación superior al de las semillas de las placas control (**Figura 2**), indicando que todos estos tratamientos actúan favorablemente bien sobre la capacidad de germinación de las semillas, bien sobre el desarrollo radicular, o bien sobre ambos parámetros. La dosis de 6×10^2 UFC/placa (0,006 ml de Azobac) era la que producía los mejores valores de índice de germinación (**Figura 2**), mientras que dosis entre 5×10^5 UFC y 10^6 UFC inhibían completamente la germinación, y dosis entre 10^5 y 3×10^5 UFC daban lugar a índices de germinación inferiores al control. Volvemos a observar aquí, como ocurría en el caso de la elongación de tallos y raíces, una tendencia a seguir una curva de Gaus como respuesta a la dosis de biofertilizante.

Efecto fitohormonal auxínico de *Zotobacter* + *Azospirillum*

Con el fin de comprobar si el efecto fitohormonal del biofertilizante ensayado, observado en los experimentos de germinación realizados, era de tipo auxina, se realizó un ensayo de crecimiento de coleóptilos de avena. Para ello, se germinaron sobre vermiculita, en oscuridad y a 25 °C, semillas esterilizadas de avena, seleccionando a las 72 horas de la siembra coleóptilos de 25-30 mm para

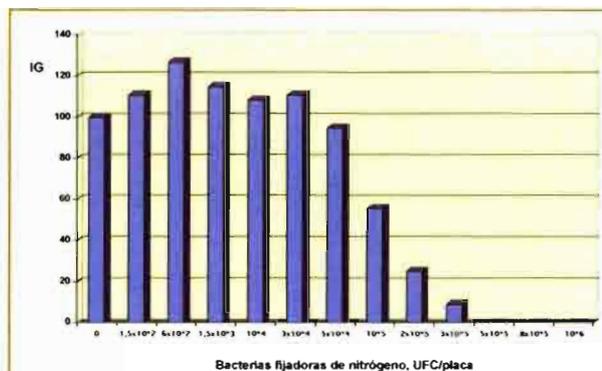


Figura 2. Índice de germinación (%) de las semillas de cebada germinadas sobre perlita tratada con diferentes concentraciones de inóculo bacteriano

cortarlos en secciones subapicales uniformes de seis mm de longitud. Estas secciones se mantuvieron en una disolución tampón de KH_2PO_4 0,01 M (pH = 4,5) con 2 % de sacarosa (disolución basal) durante una hora, a fin de eliminar la auxina endógena, colocándolas a continuación, por duplicado, en cápsulas Petri estas secciones con 20 ml, bien de la disolución basal anterior (control), bien de la disolución del biofertilizante a ensayar a diferentes concentraciones. Estas cápsulas con los segmentos de coleóptilos de avena se incubaron en la oscuridad durante 24 horas, midiendo a continuación con un estereomicroscopio con micrómetro ocular la longitud de las secciones.

Como puede observarse en la **Figura 3**, en este ensayo se pudo detectar un efecto fitohormonal tipo auxina, obteniéndose una mayor elongación en los segmentos



Figura 3 Imagen de coleóptilo expuesto al inóculo de bacterias fijadoras de nitrógeno (producto Azobac) (coleóptilo superior) en comparación con el expuesto a la disolución basal (coleóptilo inferior)

de coleóptilos de avena incubados con la disolución conteniendo la mezcla de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter* + *Azospirillum*) del biofertilizante comercial AZOBAC, que con el medio basal (CONTROL).

Conclusiones

A partir de los datos obtenidos en estos experimentos podemos concluir que las bacterias fijadoras de nitrógeno contenidas en el producto Azobac (mezcla de *Azotobacter* y *Azospirillum*), con independencia de su capacidad para fijar nitrógeno, ejercen una acción estimulante sobre el crecimiento vegetal, particularmente al nivel de raíces. Esta acción estimulante parece ser de tipo hormonal ya que se pone de manifiesto en los primeros estadios del desarrollo de la planta (germinación) cuando las necesidades nutritivas no son un factor limitante del crecimiento, observándose una respuesta a la dosis tipo campana de Gauss, característica de las sustancias de tipo hormonal, siendo el efecto fitohormonal observado de tipo auxina.

Bibliografía

- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. and Döbereiner, J. 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. In Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 4: 37-40.
- Millet, E., and Fieldman, M. 1984. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant and Soil*, 80: 255-259.
- Murty, M.G., and Ladha, J.K. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant and Soil*, 108: 281-285.
- Ocón, Y. and Kapulnic, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil*, 90: 3-16.
- Ocón, Y., Labandera-Gonzalez, C.A. 1994. Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1591-1601