

## PRESENCIA DE *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* EN RIZOSFERA DE ALGUNAS PLANTAS CULTIVADAS Y SILVESTRES

R. Alvarez (1)

Recibido: 15/12/82

Aceptado: 4/8/83

### RESUMEN

Diez cepas de organismos con características morfológicas semejantes a las de *Azospirillum* sp. y capaces de reducir acetileno fueron aisladas de la rizosfera de distintas plantas. Tres de estas cepas presentaron un comportamiento fisiológico típico de *Azospirillum lipoferum* en tanto que otras tres lo hicieron como *Azospirillum brasilense*. Una de las cepas no pudo ser clasificada ya que poseía algunas de las características de *Azospirillum lipoferum* y otras de *Azospirillum brasilense*. Las cepas restantes mostraron casi todas las características de *Azospirillum brasilense* y aunque no fueron capaces de desarrollar sin biotina, se consideró que pertenecían a esta especie.

### PRESENCE OF *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* IN THE RHIZOSPHERE OF SOME CULTIVATED AND WILD PLANTS

### SUMMARY

Ten strains of organism with morfological characteristics similar to those of *Azospirillum* spp. and able to reduce acetylene were isolated from the rizosphere of different plants. Three of this strains showed a physiological behavior typical of *Azospirillum lipoferum* meanwhile three more gave typical reactions of *Azospirillum brasilense*. One of the strains could not be classified because it showed some properties of *Azospirillum lipoferum* and others of *Azospirillum brasilense*. The rest of the strains presented nearly all the characteristics of *Azospirillum brasilense* and in spite of they were not able to grow without biotin, they were considered to belong to this species.

### INTRODUCCION

*Spirillum lipoferum* (*Azospirillum* sp.) fue primeramente aislado y descripto por Beijerinck (1925) en Holanda pero durante casi 50 años el mismo permaneció ignorado, hasta que fuera redescubierto en Brasil (Bülow y Döbereiner, 1975; Day y Döbereiner, 1976; Döbereiner *et al.*, 1976). En la Argentina lo aislaron por primera vez Merzari *et al.*

(1977) y desde entonces, debido a la creciente importancia de la fijación biológica de nitrógeno, el conocimiento sobre *Spirillum lipoferum* se ha incrementado enormemente. La creación del género *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978) para sustituir al antiguo *Spirillum lipoferum* y su división en las especies *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* ha sido ampliamente aceptada en los últimos años (Baldani y Döbereiner, 1980; Charyluy

(1) Centro de Radiobiología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.

y Rajaramamohan Rao, 1980; Cohen *et al.*, 1980; Ladha *et al.*, 1982).

La distribución ecológica de este microorganismo, considerada por Döbereiner *et al.* (1976) como característica de los suelos tropicales, ha demostrado ser más amplia de lo sostenido por dichos autores y en la Argentina se ha aislado hasta de los suelos de la Patagonia (Pozzo Ardizzi, 1981). En virtud de ello se inició el presente trabajo con el intento de comprobar su presencia en la rizosfera de plantas cultivadas y silvestres provenientes de distintos ambientes.

## MATERIAL Y METODOS

### Aislamiento de microorganismos

Plantas enteras o raíces cortadas, con o sin pan de tierra, fueron llevadas al laboratorio en bolsas de polietileno. Luego de lavar las raíces con agua destilada estéril, trozos de aproximadamente un centímetro de longitud fueron sembrados en medio semisólido de malato modificado (Döbereiner *et al.*, 1976), al cual se le disminuyó el sulfato ferroso a 0,005 g/l. Tras incubar los cultivos a 30°C durante 3 ó 4 días, de aquellos tubos en que se formaba una película subsuperficial, blanca y densa, se repicó a otros tubos y éste procedimiento se repitió 2 ó 3 veces en cada caso hasta lograr una alta predominancia de

organismos semejantes por sus características morfológicas y su movimiento a las descritas para *Spirillum lipoferum* (Beijerinck, 1925; Döbereiner *et al.*, 1976). Del material así enriquecido se hicieron estrías en cajas de Petri sobre el mismo medio de cultivo y de éstas se picó colonias aisladas a tubo, repitiéndose el procedimiento tantas veces como fuera necesario hasta obtener cultivos puros. En el Cuadro 1 se indica el origen de cada una de las cepas aisladas.

### Desarrollo de los cultivos en cajas

Fueron estudiadas las características de los organismos en el medio de malato citado, en agar-papa-malato-sacarosa, preparado según Döbereiner *et al.* (1976), en caldo de carne peptonado y en caldo de carne peptonado glucosado. En todos los casos las pruebas se realizaron a 30°C.

### Pruebas fisiológicas

Se investigó la habilidad de las cepas para desarrollar anaeróbicamente con nitrato como fuente de oxígeno y la producción de acidez a partir de fructosa por los métodos de Hylemon *et al.* (1973). La capacidad de desarrollar sin biotina y de producir formas inmóviles de 40-50 micrones de largo, con 2-3 vueltas, fue investigada por los métodos de Tarrand *et al.* (1978). Para determinar la produc-

CUADRO 1: Origen de las cepas estudiadas.

Cepa	Aislada de rizosfera de:	Origen de la planta
1	<i>Heleocharis bonariensis</i>	Luján, Buenos Aires
2	<i>Chichorium intybus</i>	Facultad de Agronomía, UBA
3	<i>Triticum aestivum</i>	Facultad de Agronomía, UBA
4	<i>Taraxacum officinale</i>	Henderson, Buenos Aires
5	<i>Stipa brachychaeta</i>	Facultad de Agronomía, UBA
6	<i>Cynodon dactylon</i>	Luján, Buenos Aires
7	<i>Bromus unioloides</i>	Tigre, Buenos Aires
8	<i>Bulnesia sarmientoi</i>	Formosa
9	<i>Trifolium pratense</i>	Tigre, Buenos Aires
10	<i>Triticum aestivum</i>	La Dulce, Buenos Aires

ción de acidez a partir de glucosa se usó el medio líquido de Tarrand *et al.* (1978) para tubo de ensayo, probando con glucosa filtrada y glucosa autoclavada con el medio a 121 grados centígrados durante 15 minutos. La habilidad de producción de ácido a partir de glucosa en medio anaeróbico se investigó en el mismo medio, esterilizado con tapón de vaselina-parafina y agregando la glucosa tinalizada caliente para lograr una concentración final del 1 por ciento.

La actividad nitrogenásica se determinó por reducción de acetileno en cultivos de 72 horas, desarrollados en frascos de 27 cm<sup>3</sup> con 10 cm<sup>3</sup> del medio semisólido de malato usado en el aislamiento. Luego de 3 horas de incubación de los mismos a 30°C bajo una atmósfera con 10 por ciento de acetileno se midió colorimetricamente el etileno producido, (LaRue y Rurz, 1973).

## RESULTADOS

### Desarrollo en medio semisólido

Todas las cepas produjeron una película subsuperficial blanca y densa compuesta de espirilos Gram negativos de media o una vuelta, con 5 a 15 micrones de largo por aproximadamente un micrón de ancho. Las células presentaron gránulos de grasa y mostraron el movimiento típico de *Azospirillum* sp, avance y retroceso de la célula con curvatura de la pared celular y rotación radial.

### Desarrollo en medio sólido de malato

Colonias de 1-2 mm de diámetro a los 7 días, convexas, duras o mucosas según la calidad del agar. Los organismos presentaron la forma de vibriones o espirilos cortos, con corpúsculos y poco móviles.

### Desarrollo en agar-papa-malato-sacarosa

Entre los 5 y 10 días se formaron en todos los casos colonias de 2 a 5 mm de diámetro, rosadas, duras y de centro hundido. Las

células se presentaron como vibriones con muy pocos corpúsculos o sin ellos y de escasa movilidad. A medida que los cultivos envejecieron la longitud de los organismos se fue acortando, observándose a los 15 días una mezcla de vibriones y formas redondas.

### Desarrollo en caldo de carne peptonado

Se observaron colonias blancas, blandas de 2 a 5 mm de diámetro entre los 5 y 10 días. Microscópicamente el aspecto fue semejante al del medio anterior y también se acertaron las células en cultivos viejos.

### Desarrollo en caldo de carne peptonado glucosado

Las cepas 4, 5 y 6 produjeron a los 10 días colonias de 8 mm de diámetro o más, no pigmentadas, que tomaban el color del medio, mucosas y compuestas de espirilos móviles con corpúsculos. La cepa 10 dió origen a colonias consistentes de 2 a 5 mm, constituidas también por organismos móviles con corpúsculos. El resto de los cultivos produjo colonias de 2 a 5 mm, consistentes pero compuestas por vibriones en general sin corpúsculos y poco móviles. En todos los casos en cultivos viejos se observaron mezclas de vibriones y formas redondas.

### Pruebas fisiológicas

En el Cuadro 2 se sintetizan las características fisiológicas estudiadas. Como puede verse en el mismo, la totalidad de los organismos aislados fueron capaces de reducir acetileno y utilizar nitrato como fuente de oxígeno. La acidificación del medio a partir de fructosa también fue común a todos ellos, aunque en el caso de la cepa 10 la acidez sólo se hizo notable a partir del 8º día de cultivo, mientras que el resto de ellas dió reacción positiva antes del cuarto. La lentitud de esta cepa para acidificar se debe a su mayor poder de alcalinizar por degradación de la peptona. Si se elimina ésta del medio del cultivo a las 24 horas se evidencia una intensa

CUADRO 2: Propiedades fisiológicas de las cepas.

Cepa No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Actividad nitrogenásica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Respiración de nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de ácido de fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
Desarrollo sin biotina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Espirilos inmóviles de hasta 50 micrones	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Producción de ácido de glucosa	-	-	-	+	+	+	-	-	-	±
Producción anaeróbica de ácido de glucosa	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-

acidez, como sucede con el resto de las cepas. En los medios utilizados para realizar las dos últimas pruebas mencionadas, las células se presentaron como vibriones móviles sin corpúsculos en su mayoría y las cepas 1, 2, 3 y 8 formaron cuerpos redondos observables a los 10 días.

Las propiedades fisiológicas descriptas hasta aquí fueron observadas en cultivos incubados a 30°C. Para determinar el resto de las características los organismos se incubaron a 37°C excepto en el caso de las cepas 7, 8 y 9 que no desarrollaron a esta temperatura y debieron ser mantenidos a 30°C para completar los estudios.

Solo las cepas 1, 2 y 3 fueron capaces de desarrollar sin biotina, produciendo una intensa turbidez en el medio líquido y una película superficial. Al microscopio las células se veían como vibriones móviles en general no corpusculados y a los 4 días de la siembra se observaron formas redondas.

El desarrollo de espirilos inmóviles de hasta 50 micrones de largo con 2 ó 3 vueltas fue característica propia de las cepas 4, 5, 6 y 10 y se observaron a los 4 días de haber

sembrado. En cultivos más jóvenes todos los organismos fueron semejantes, espirilos cortos y móviles, manteniéndose estas propiedades pasados 4 días en el resto de las cepas.

La acidificación del medio producida por las cepas 4, 5 y 6 fue evidente a los 4 días de la siembra, tanto con glucosa filtrada como autoclavada. En el caso de la cepa 10, se observó la producción de ácido al octavo día de la siembra en ambos casos. Todos los demás organismos desarrollaron bien en el medio, enturbiándolo y en algunos casos formando película superficial, pero no acidificaron, cualquiera hubiese sido el sistema de esterilización de la glucosa. En cultivos jóvenes el aspecto de todas las cepas fue semejante, vibriones móviles por lo común sin corpúsculos. Al envejecer los cultivos se notó la aparición de formas redondas en el caso de las cepas 1, 2, 3 y 8.

Con respecto a la generación anaeróbica de acidez, ésta fue evidente también al cuarto día de sembrar en el caso de las cepas 4, 5 y 6. Las demás, excepto la 10, desarrollaron escasamente generando una turbidez apenas perceptible, lo cual demuestra una limitada

capacidad de desarrollo anaeróbico. La última cepa citada no desarrolló. Los cultivos estuvieron constituidos por vibriones móviles por lo común sin corpúsculos y no se observaron formas redondas en cultivos viejos.

## DISCUSION

### Aislamiento y purificación

El aislamiento de *Azospirillum* sp en el medio semisólido utilizado es muy simple ya que basta con sembrar un pequeño trozo de raíz para obtener al cabo de unos pocos días el desarrollo de los microorganismos buscados. Sin embargo, la purificación suele ser bastante difícil porque los contaminantes, supuestamente oligonitrófilos, desarrollan muy bien en este medio y al estriar el material en caja predominan sobre *Azospirillum* sp. Muchos de estos contaminantes son pequeños bastones, móviles o no, Gram negativos que aislados en cultivo puro muestran una reducida actividad nitrogenásica. Es necesario por lo tanto, antes de estriar la mezcla bacteriana en la caja, lograr el mayor enriquecimiento posible de espirilos, lo cual puede lograrse fácilmente por el sucesivo repique de tubo a tubo.

El agregado de rojo congo a los medios de cultivo (Rodríguez Cáceres, 1981) puede facilitar el reconocimiento de las colonias de *Azospirillum* sp, pero en muchos casos otros microorganismos, cuyas colonias se parecen a las de *Azospirillum* sp, también concentran el colorante, por lo que es necesaria la observación microscópica.

### Reconocimiento del género *Azospirillum*

Todas las cepas aisladas presentaron en el medio semisólido de malato el típico aspecto de *Azospirillum* sp, con gránulos de grasa y movilidad característica, formaron película subsuperficial blanca y densa y mostraron actividad nitrogenásica. En agar-papa-malato-sacarosa las colonias también fueron características (Döbereiner *et al.*, 1976). Es-

tas propiedades, sumadas a la habilidad de obtener oxígeno del nitrato y de acidificar el medio a partir de fructosa, permiten ubicar a los organismos aislados en el género *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978) y diferenciarlos así de otros espirilos fijadores de nitrógeno (Hylemon *et al.*, 1973; Strength *et al.*, 1976).

### Identificación de las especies

Las cepas 1, 2 y 3 mostraron un comportamiento típico de *Azospirillum brasilense* ya que fueron capaces de desarrollar sin biotina, no produjeron espirilos largos e inmóviles ni generaron acidez a partir de glucosa (Tarrand *et al.*, 1978). Todo lo contrario puede decirse de las cepas 4, 5 y 6 que por sus características pertenecen a la especie *Azospirillum lipoferum*. En cuanto a las cepas 7, 8 y 9, si bien no fueron capaces de desarrollar sin biotina, mostraron todas las demás propiedades de *Azospirillum brasilense* y pueden considerarse como mutantes que han perdido la capacidad de sintetizar la vitamina. Es de hacer notar que estas cepas tampoco fueron capaces de desarrollar a 37°C.

La cepa 10 presentó características de *Azospirillum lipoferum* como la formación de largos espirilos, la incapacidad de crecer sin biotina, la producción de acidez en medio aeróbico sobre glucosa, aunque esta propiedad sólo se evidenció al octavo día de la siembra y en caldo de carne peptonado glucosado produjo espirilos móviles con corpúsculos. Por otra parte también mostró características de *Azospirillum brasilense* como la incapacidad de acidificar anaeróbicamente sobre la glucosa y la formación de colonias pequeñas en caldo de carne peptonado glucosado. Por lo expuesto, sería un poco arbitrario asignarla a una u otra especie y posiblemente sea mejor dejarla por el momento sin clasificar.

## CONCLUSION

Durante la ejecución de este trabajo se ha aislado *Azospirillum* sp de la rizosfera de

plantas de muy distinta filiación botánica, provenientes en algunos casos de lugares alejados del país. Si se suma a éste los reportes anteriores de la presencia de *Azospirillum* sp en la Argentina (Merzari *et al.*, 1977; Pozzo Ardizzi, 1981; Simon, 1981), se llega a la conclusión de que estos microorganismos se hallan ampliamente difundidos.

Con respecto a la determinación de la presencia de *Azospirillum* sp, ésta es sencilla y basta normalmente con la observación de algunas características morfológicas para poder afirmarla, ya que existe una total correlación entre ellas y las propiedades fisiológicas características del género. Por el contrario, para asignar un organismo a alguna de las especies establecidas es necesario realizar el mayor número de pruebas posibles ya que algunas cepas no se ajustan totalmente a las descripciones existentes.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Baldani, V. L. D. and Döbereiner, J., 1978. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* 12: 433-439.
- 2) Beijerinck, M. W., 1925. Über ein *Spirillum*, welches frein Stickstoff binden kann?. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt 2*, 63: 353-359.
- 3) Bülow, J. F. W. and J. Döbereiner, 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 2389-2393.
- 4) Charyulu, P. B. B. N. and Rajaramamohan Rao, V., 1980. Influence of various soil factors on nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* 12: 343-346.
- 5) Cohen, E.; Ocon, Y.; Kigel, J.; Nur, I. and Henis, Y. 1980. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* Associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.* 66: 746-749.
- 6) Day, J. M. and Döbereiner, J., 1976. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.* 8: 45-50.
- 7) Döbereiner, J.; Marriel, J. E. and Nery, M., 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
- 8) Hylemon, P. H.; Wells, J. S.; Krieg, N. R. and Jannasch, H. W., 1973. The genus *Spirillum*: a taxonomic study. *Int. J. Syst. Bact.* 23: 340-380.
- 9) Ladha, J. K.; Barraquio, W. L. and Watanabe, I., 1982. Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 28: 478-485.
- 10) LaRue, T. A. and Kurz, W. G. W., 1973. Estimation of nitrogenase using a colorimetric determination for ethylene. *Plant Physiol.* 51: 1074-1075.
- 11) Merzari, A. H.; Carpio, D. y Alonso, M. R., 1977. Presencia de *Spirillum lipoferum*, fijador de nitrógeno atmosférico, en suelos y rizosfera de *Zea mays* y *Triticum aestivum*. III Reunión Nacional de Fertilidad y Fertilizantes. Buenos Aires, 28 de noviembre-1<sup>o</sup> de diciembre de 1977. Argentina.
- 12) Pozzo ardizzi, M. G., 1981. Identificación de sitios de fijación de nitrógeno en raíces de algunas gramíneas infectadas por *Azospirillum* sp. I Reunión Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. La Plata, 11-13 de noviembre de 1981. Argentina.
- 13) Rodríguez Cáceres, E. A., 1981. Nuevo medio para aislar *Azospirillum* sp. I Reunión Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. La Plata, 11-13 de noviembre de 1981. Argentina.
- 14) Simon, C. P., 1981. *Azospirillum* sp en rizosfera de Cactaceas (*Opuntia* sp). I Reunión Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. La Plata, 11-13 de noviembre de 1981. Argentina.
- 15) Strength, W. J.; Isani, B.; Linn, D. M.; Williams, F. D.; Vandermolén, G. E.; Laughon, B. E. and Krieg, N. R., 1976. Isolation and characterization of *Aquaspirillum fasciculus* sp nov, a rod-shaped, nitrogen-fixing bacterium having unusual flagella. *Int. J. Syst. Bact.* 26: 253-268.
- 16) Tarrand, J. J.; Krieg, N. R. and Döbereiner, J., 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.