

## Actividad de fosfatasa-alcalina y crecimiento del arroz con inoculación biológica y micronutrientes

Maura Isabel Díaz Lezcano<sup>1§</sup>

Carlos Fiori Fernández<sup>2</sup>

Líder Ayala Aguilera<sup>1</sup>

Fátima Yubero<sup>3</sup>

Roberto Martínez López<sup>4</sup>

Marcelo López<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. (lider.ayala@agr.una.py). <sup>2</sup>Maestría en Ciencias en Biotecnología-Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. (fiorif88@gmail.com). <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo. (fyubero@qui.una.py). <sup>4</sup>Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica-Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. (zoogen.py@gmail.com). <sup>5</sup>Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo. Paraguay. (marcelolopez3@hotmail.com).

§Autora para correspondencia: maura.diaz@agr.una.py.

### Resumen

La inoculación con bacterias promotoras del crecimiento en cultivos es una alternativa para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados y los costos de producción. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inoculación de semillas de arroz *Oryza sativa* L. con la bacteria *Azospirillum brasilense* sobre la actividad enzimática de la fosfatasa-alcalina y su crecimiento. Se realizó en la Facultad de Ciencias Agrarias y la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y cinco repeticiones. Los tratamientos consistieron en T1 (Control absoluto): semillas de arroz sin tratamiento, T2 (Co+Mo): semillas de arroz tratadas con cobalto más molibdeno, T3 (Az): semillas de arroz inoculadas con *A. brasilense*, T4 (Az+1F): semillas de arroz inoculadas con *A. brasilense* más una aplicación foliar del inoculante y T5 (Az+2F): semillas de arroz inoculadas más dos aplicaciones foliares. Se aplicó Anava y la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el análisis de las variables agronómicas y la prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ) para las evaluaciones enzimáticas. Las variables evaluadas fueron longitud de raíces (cm), masa seca de partes aéreas y raíces (g) y la actividad enzimática la fosfatasa-alcalina ( $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ ). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos con *Azospirillum brasilense* respecto a la masa seca. La actividad fosfatasa en los tratamientos con *A. brasilense* osciló entre 1 655.49 en el T3 y 7429,55  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$  en el T4. La utilización de micronutrientes a base de cobalto y molibdeno propició un mayor crecimiento de raíces.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense*, *Oryza sativa* L., actividad enzimática, inoculación.

Recibido: febrero de 2020

Aceptado: mayo de 2020

## Introducción

Paraguay experimenta en los últimos años un crecimiento en cuanto a superficie cultivada y rendimiento de arroz irrigado, con más de 140 000 ha cultivadas, la misma va acompañada de innovaciones tecnológicas, insumos, semillas, investigaciones y otros focalizando en las exportaciones.

El arroz se ha mantenido dentro de los estándares de producción, apuntando cada vez más a incrementar su producción de manera anual y continua (MAG, 2018) La inoculación con bacterias promotoras del crecimiento en cultivos es una alternativa para reducir el uso de compuestos químicos minimizando el daño ambiental y los costos de producción (Brito *et al.*, 2018).

La generación de nuevos conocimientos mediante el uso de bacterias como las del género *Azospirillum brasilense* puede contribuir a mejorar los rendimientos y al mismo tiempo representar una alternativa sostenible con relación a los fertilizantes químicos.

La inoculación con bacterias del género *Azospirillum* en plantas conlleva a un aumento significativo del sistema radical, además de inducir resistencia a agentes patógenos y proveer de elementos tan necesarios como el nitrógeno, inhibe la proliferación de plantas parásitas y produce hormonas que estimulan el crecimiento vegetal, lo que permite un desarrollo más económico y saludable de los cultivos (Bouillant *et al.*, 1997).

Los microorganismos cumplen un papel en procesos que afectan la transformación del fósforo en el suelo y su disponibilidad para las plantas. Con el fin de evaluar la biodisponibilidad de la presencia de fosfatos en el cultivo se utilizó la medida de la actividad de la enzima fosfatasa-alcalina de los suelos, en la zona de la rizosfera, franja habitada por estas bacterias.

En particular, pueden solubilizar y mineralizar formas de fósforo orgánicas e inorgánicas; a través, de mecanismos, como la liberación de ácidos orgánicos y de enzimas hidrolíticas que incrementan la movilización y disponibilidad de este elemento para la nutrición de las plantas (Fernández-Rodríguez, 2005). El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta agronómica del arroz *O. sativa* L. cuyas semillas fueron inoculadas con *A. brasilense*; a través, de la medida de la actividad fosfatasa en el suelo.

## Materiales y métodos

### Localización

El experimento se instaló en condiciones de invernadero en la Facultad de Ciencias Agrarias, donde se realizaron las evaluaciones morfo-agronómicas. Los análisis enzimáticos del suelo se realizaron en el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, ambas unidades académicas pertenecientes a la Universidad Nacional de Asunción situada en San Lorenzo, Paraguay.

## Material vegetal

Se utilizó un kilogramo de semillas comerciales de arroz (Cuadro 1), fueron fraccionadas en tres lotes de 500, 300 y 200 g. EL lote de 500 g recibió un tratamiento químico con una mezcla de fungicidas consistentes en Carbendacín más Thiran a razón de 2 mL e insecticidas Imidacloprid más Thiodicarb razón de 5 mL.

**Cuadro 1. Análisis de calidad del lote de semillas de arroz *Oryza sativa* L., utilizado para el experimento.**

| Peso de muestra (g) | Plántulas normales (%) | Plántulas anormales (%) | Germinación (%) | Pureza física (%) | Material inerte (%) | Humedad (%) |
|---------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|---------------------|-------------|
| 700                 | 84                     | 11                      | 84              | 99.6              | 0.4                 | 12.7        |

El lote de 300 g de semillas se utilizó para inocularlas con cepas comerciales de *A. brasilense*, con un formulado comercial con una concentración de  $1 \times 10^9$  bacterias viables por mL en el momento de elaboración a razón de 6 mL. Del total de 200 g, se utilizaron 100 g que recibió tratamiento con micronutrientes de cobalto más molibdeno a razón de 0.3 mL y los restantes 100 g que no recibió tratamiento alguno fueron dispuestos como control.

## Siembra de semillas de arroz

Para la siembra de las semillas se colocaron tres kilogramos de suelo homogeneizado en 25 macetas de 24 cm de diámetro y 22 cm de altura, con una capacidad total de siete litros, las mismas fueron colocadas en condiciones de invernadero. Se sembraron aproximadamente 40 semillas por recipiente a un centímetro de profundidad distribuidas uniformemente.

Luego de la germinación y emergencia se mantuvo una lámina de dos centímetros de agua sobre la superficie hasta el final del experimento y evaluaciones morfoagronómicas. Posterior a la emergencia y luego de haber desarrollado doce hojas verdaderas, antes del primer macollo, se procedió a pulverizar dos veces las hojas a intervalos de diez días con el mismo producto a base de *A. brasilense* a razón de 10 mL en 350 mL de agua destilada esteril.

## Sustrato utilizado

Se utilizó una muestra de suelo como sustrato proveniente de una finca arrocera situada en la Compañía Ype ka'e del Distrito de Villeta, a 70 km de la ciudad de Asunción, Paraguay. La misma poseía una textura arenosa y coloración marrón clara, clasificada dentro del subgrupo de suelos *Typic Albaqualf* (Al) correspondiente al orden Alfisoles (López *et al.*, 1995) y cuyas características químicas se exponen en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Características químicas del sustrato utilizado para la siembra de arroz.**

| Profundidad (cm) | pH | Materia orgánica (%) | P (mg kg <sup>-1</sup> ) | Ca <sup>+2</sup> | Mg <sup>+2</sup> | K <sup>+</sup> | Na <sup>+</sup> | Al <sup>+3</sup> +H <sup>+</sup> |
|------------------|----|----------------------|--------------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------------------------|
| 0-10             | 5  | 1.21                 | 11.9                     | 2.4              | 1.41             | 0.13           | 0.38            | 0.94                             |

## **Evaluación enzimática**

Paralelamente se procedió a determinar la actividad enzimática de la fosfatasa-alcalina, para la misma se tomaron muestras de suelo de los cinco recipientes por tratamiento, fue homogeneizada y enrasada a un peso de 100 g totalizando de esa manera cinco muestras de 100 g cada una, las mismas fueron conservadas en recipientes estériles a la temperatura de 7 °C hasta el momento de su análisis.

## **Determinación de actividad fosfatasa**

Se procedió según lo descrito por Becerra *et al.* (2011).

## **Variables evaluadas**

La evaluación de las variables agronómicas se realizó luego del panojamiento y llenado de los granos, las mismas consistieron en: longitud de raíces, expresadas en centímetros con una regla milimetrada fueron medidas las raíces de un total de cincuenta plantas de cada tratamiento y repetición. Masa seca de partes aéreas, se dispuso en una estufa a 70 °C durante tres días para luego pesarlas en una balanza analítica. Masa seca de raíces, se utilizó la misma metodología de la masa seca de partes aéreas.

Actividad enzimática fosfatasa, se midieron los microgramos de paranitrofenol por gramo de suelo por hora ( $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ ) mediante una técnica colorimétrica, utilizando un espectrofotómetro, determinándose la concentración de paranitrofenol resultante del desdoblamiento del paranitrofenil fosfato.

## **Tratamientos**

Los tratamientos consistieron en: T1 (control)= semillas sin ningún tipo de tratamiento, T2 (Co + Mo)= semillas con tratamiento químico de cobalto más molibdeno, T3 (Az)= semillas inoculadas con *A. brasilense*, T4 (Az + 1F)= semillas inoculadas con *A. brasilense* más una aplicación foliar del inoculante a razón de 10 mL.

Por unidad experimental y T5 (Az + 2F) = semillas inoculadas con *A. brasilense* más dos aplicaciones foliares del inoculante a razón de 10 mL por unidad experimental luego de diez días de la primera aplicación. Solamente el T5 (Az + 2F) recibió dos aplicaciones foliares.

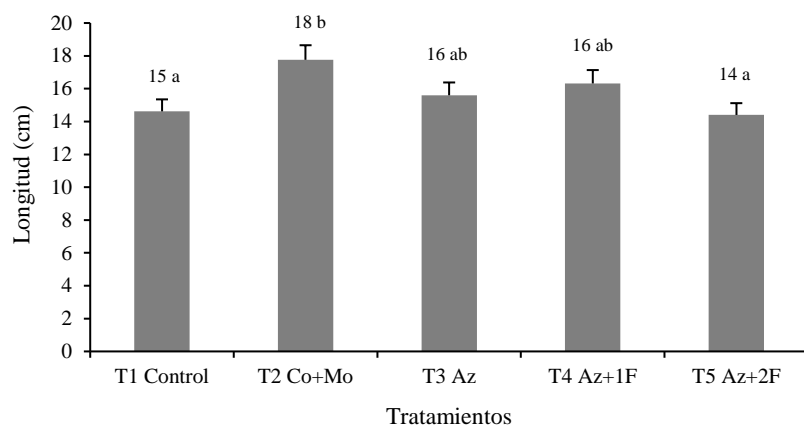
## **Diseño experimental y análisis de datos**

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cinco tratamientos por cinco repeticiones. Las medias de las mediciones agronómicas fueron sometidas a Anava y las variables que presentaron significancia estadística fueron comparadas con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los datos de los análisis bioquímicos fueron sometidos a la prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ), esta prueba ha sido utilizado ya que los datos no presentaban normalidad.

## Resultados y discusión

### Longitud de raíces

En la Figura 1 se observan los datos referentes a la longitud de raíces, la misma muestra que en el tratamiento 2, correspondiente al grupo de semillas tratadas con cobalto más molibdeno (Co + Mo), presentó diferencia significativa comparado con control y el tratamiento 5 que componen semillas inoculadas más dos aplicaciones foliares (Az + 2F) pero no así con los tratamientos 3, consistente en semillas inoculadas (Az) ni con el tratamiento 4, semillas inoculadas más una aplicación foliar (Az + 1F).



**Figura 1. Longitud de raíces de plantas de arroz provenientes de semillas inoculadas con *A. brasilense* y tratadas con cobalto más molibdeno.** T1= control (testigo absoluto), semillas sin ningún tratamiento; T2= Co + Mo, semillas tratadas con cobalto más molibdeno; T3= Az, semillas inoculadas con *A. brasilense*; T4= Az + 1F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más una aplicación foliar; T5= Az + 2F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más dos aplicaciones foliares.

Sin embargo, los tratamientos 3, 4 y 5 no difieren significativamente del control por lo que según la evidencia expuesta, aparentemente resultaría más conveniente la inoculación con Co + Mo que solo con *A. brasilense* e inclusive aplicando la misma por la vía foliar observándose una mayor eficacia en la longitud de raíces solo con Co + Mo.

Estos resultados coinciden con los reportados por Santos *et al.* (2013) quienes observaron una mayor longitud radicular en plantas de arroz aplicando dosis de  $4.5 \text{ mg L}^{-1}$  de micronutrientes. Así mismo, experimentos de Askary *et al.* (2009) demuestran que el cobalto y molibdeno en semillas de arroz con dosis de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  incrementan la tasa de germinación si las mismas.

El efecto nulo de las cepas de *A. brasilense* utilizadas para la inoculación de las semillas de arroz pudo deberse a problemas de supervivencia en el suelo, debido a que el mismo no se encontraba esterilizado en el momento de su utilización, mismas observaciones fueron mencionadas por Bécquer *et al.* (2012) comentando que, en suelos no estériles, microorganismos nativos interfieren con la capacidad de colonización de *A. brasilense* por lo que es recomendable para futuras investigaciones emplear un sustrato esterilizado para de esa manera evaluar el efecto de la rizobacteria sobre el cultivo de arroz.

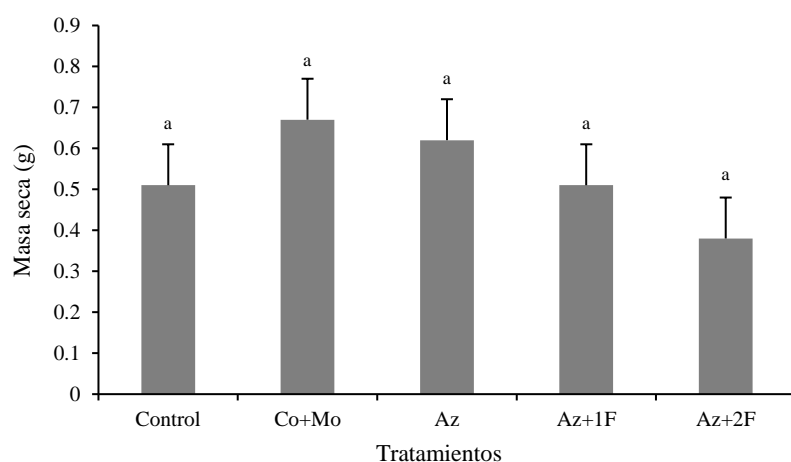
La inoculación mixta de *Azospirillum lipoferum* y el hongo micorrízico *Glomus intraradices* en plantas de sorgo, incrementó todos los parámetros de crecimiento de las plantas, la concentración de fosfatasas en raíces, así como la absorción de minerales, al compararse con inoculaciones únicas (Veereswamy *et al.*, 1992).

Al inocular trigo con *A. brasilense* y *Glomus* sp. Se incrementó el peso fresco y seco de brotes y raíces (Gori y Favilli, 1995). La inoculación doble de *Glomus macrocarpum* y *A. brasilense* en la planta *Corchorus ollitorius* promovió su crecimiento (Bali y Mukerji, 1991). La inoculación de *Azospirillum lipoferum* incrementó los contenidos de N, P y K debido al aumento de superficie radical que permite una mayor absorción de nutrientes (Salvagiotti *et al.*, 2014).

La asimilación del fósforo para las plantas depende en gran parte de la mineralización que experimentan las diferentes fracciones de dicho fósforo unidas a las formas orgánicas. Las enzimas fosfatasas son las encargadas de hidrolizar el fósforo en forma orgánica (ésteres de fosfato) hasta formas inorgánicas, haciéndolo asimilable para las plantas. La fosfatasa-alcalina es inducible por el sustrato (Burns, 1982).

### Masa seca de raíces

La masa seca de raíces de plantas arroz inoculadas con *A. brasilense* y micronutrientes de cobalto más molibdeno no arrojó diferencias significativas entre tratamientos como se observa en la Figura 2. Las mismas fueron evaluadas al final luego del panojamiento y llenado de granos.



**Figura 2. Masa seca de raíces de plantas de arroz provenientes de semillas inoculadas con *A. brasilense* y tratadas con cobalto más molibdeno.** T1= control (testigo absoluto), semillas sin ningún tratamiento; T2= Co + Mo, semillas tratadas con cobalto más molibdeno; T3= Az, semillas inoculadas con *A. brasilense*; T4= Az + 1F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más una aplicación foliar; T5= Az + 2F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más dos aplicaciones foliares.

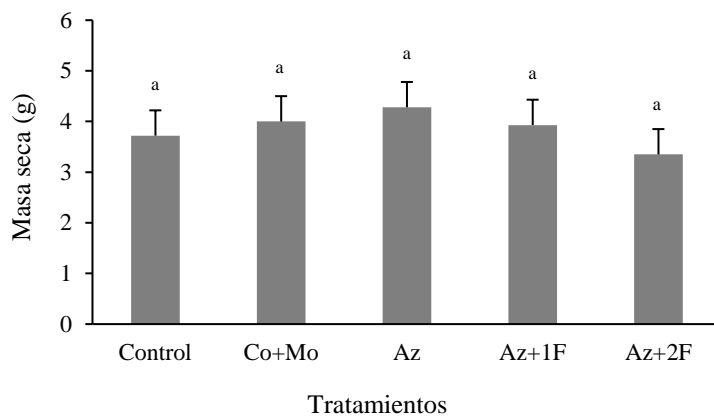
Los rangos obtenidos en esta variable van de 0.67 g para el T2 consistente en semillas tratadas con cobalto más molibdeno (Co + Mo) y 0.38 g para el tratamiento 5, consistente en semillas inoculadas más 2 aplicaciones foliares (Az + 2F). El cobalto (Co) no es un nutriente esencial para las plantas; sin embargo, es importante dentro del metabolismo de las bacterias que forman los nódulos.

Se ha observado, que en ausencia de Co, las bacterias reducen la producción de proteínas y leghemoglobina, proteína involucrada en el mantenimiento de la fijación biológica de N (Sims, 1996). El molibdeno (Mo) es un nutriente esencial que está involucrado en forma directa en el metabolismo del N del cultivo de soja, al formar parte de la nitrogenasa, enzima encargada de la fijación del N atmosférico y de nitrato reductasa. Dicha enzima es responsable de la reducción de nitrato a amonio para su posterior transformación a aminoácidos y proteínas en las plantas (Marschner, 1995).

Estos resultados no coinciden con los de García *et al.* (2010) quienes reportan un incremento en la masa seca de raíces plantas de arroz cultivadas en macetas bajo invernadero, resaltando la eficacia de este género de bacterias. Del mismo modo, Díaz-Zorita *et al.* (2006) encontraron mayores rendimientos en materia seca de raíces de trigo (*Triticum aestivum*) utilizando *A. brasilense* evidenciando efectos positivos debido a la presencia de estos microorganismos que permitieron la mejora en el crecimiento radical incrementando la capacidad de exploración del suelo y uso eficiente de recursos tales como agua y nutrientes.

### Masa seca de partes aéreas

Del mismo modo que la masa seca de raíces, el pesaje el de partes aéreas de hojas de plantas de arroz no arrojaron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 3), siendo los rangos de 4.28 g para el tratamiento 3 (Az) y 4 g observado en el tratamiento 2 (Co + Mo).



**Figura 3. Masa seca de partes aéreas de plantas de arroz provenientes de semillas inoculadas con *A. brasilense* y tratadas con cobalto más molibdeno.** T1= control (testigo absoluto), semillas sin ningún tratamiento; T2= Co + Mo, semillas tratadas con cobalto más molibdeno; T3= Az, semillas inoculadas con *A. brasilense*; T4= Az + 1F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más una aplicación foliar; T5= Az + 2F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más dos aplicaciones foliares.

Vogel *et al.* (2014) mencionan que diferentes dosis de *A. brasilense* practicadas en diferentes especies de poáceas forrajeras ayuda a incrementar la masa seca de solo algunas de ellas mientras que Dartora *et al.* (2013) indican que la eficacia de la utilización de *A. brasilense* también depende del nivel de nitrógeno en el suelo, pudiendo éstas reducir su efectividad en concentraciones deficientes como así también en altas concentraciones.

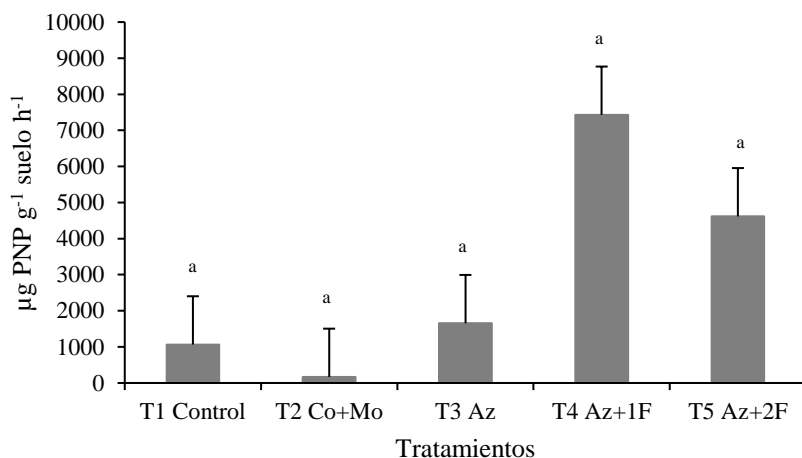


Resultados reportados por Díaz y Ortegón (2006) evidenciaron un incremento en la biomasa seca de partes aéreas de cinco muestras de canola (*Brassica napus*) en completo desarrollo indicando ocasionales inconsistencias de la respuesta de la planta ante inoculaciones con rizobacterias y no es posible generalizar su efectividad.

Kussell *et al.* (2005) mencionan que las bacterias desarrollan mecanismos para mantener la viabilidad celular durante la inanición y reanudar el crecimiento cuando los nutrientes estén disponibles, éstos incluyen entre otros una variación de fase que ha sido propuesta como un mecanismo importante por el cual los microorganismos se adaptan a los cambios ambientales tales como los existentes en la rizosfera del suelo (Van den Broek *et al.*, 2005).

### Estudio de la biodisponibilidad del fosfato soluble en el suelo: actividad enzimática fosfatasa del suelo

En la Figura 4 se observa que el tratamiento 3 consistente en semillas inoculadas con de *A. brasilense* (Az) arrojó un total de 1 655.49  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ , 590.75 veces más que el control (testigo absoluto) y 1 488.69 veces mayor que el tratamiento 2, consistente en semillas tratadas con cobalto más molibdeno el cual arrojó un valor de 168.8  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ .



**Figura 4. Actividad enzimática fosfatasa de muestras de suelo utilizadas para el cultivo de arroz en los diferentes tratamientos con *A. brasilense* y tratadas químicamente.** T1= control (testigo absoluto), semillas sin ningún tratamiento; T2= Co + Mo, semillas tratadas con cobalto más molibdeno; T3= Az, semillas inoculadas con *A. brasilense*; T4= Az + 1F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más una aplicación foliar; T5= Az + 2F= semillas inoculadas con *A. brasilense* más dos aplicaciones foliares.

El tratamiento 4 que contenía el grupo de semillas inoculadas con *A. brasilense* más una aplicación foliar del mismo producto (Az + 1F) fue el que presentó el máximo valor, siendo el mismo de 7 429.55  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ . Por último, se observa que la actividad fue menor en el tratamiento 5 conformado por el grupo de semillas inoculadas cuyo follaje de las plantas fue pulverizado dos veces con el inoculante (Az + 2F).



Se registró un valor de 4 616.19  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$  siendo esta última 3551.45 veces mayor que el control (testigo absoluto) y 4 449.39 veces que el tratamiento 2, así mismo la actividad fosfatasa en los suelos que contenía semillas tratadas con cobalto y molibdeno tampoco demostró significancia respecto al control ( $p > 0.05$ ).

Sin embargo, estos valores son un poco mayores en relación con los reportados por Paz-Ferreiro (2007) partiendo éstos de 55.6 a 4017  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$  y los obtenidos por Paul y Clark (2007) siendo de 12.51 a 56 295  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ . Al respecto, Henríquez *et al.* (2014) menciona que la actividad fosfatasa se correlaciona con el porcentaje de carbono en el suelo.

Estudios realizados por Dalurzo *et al.* (2000) mencionan que la actividad fosfatasa tiende a disminuir en aquellos suelos sometidos a labranza convencional. La reducción de la actividad de la fosfatasa en las áreas cultivadas, tanto bajo labranza convencional como siembra directa, se relaciona con el efecto inhibitor del uso de fuentes de fósforo rápidamente solubles que es lo que sucede en suelos ácidos (Rodríguez *et al.*, 2012).

Otro tipo de actividades promotoras del crecimiento vegetal, asociadas a la disponibilidad de P en el suelo, es la solubilización ácida del P inorgánico y la mineralización del P orgánico, mediadas por la acción de fosfatasas ácidas y alcalinas, produciéndose en función al pH de suelo (Nash, 2007). El bajo contenido de materia orgánica y fósforo pudo haber sido compensado mediante la promoción de esta enzima debida a la aplicación de *A. brasilense* ya que los mismos son promotores o potenciadores de enzimas (Martínez-Gallegos *et al.*, 2007).

Aparentemente es posible la ocurrencia de simbiosis de *A. brasilense* con algunos otros microorganismos fúngicos presentes de manera natural en el suelo permitiendo de esa manera la eficiencia en el transporte de fósforo en la planta como lo demuestra en sus resultados Ibarra-Puón *et al.* (2014).

Trabajo realizado por Salgado *et al.* (2010) mencionan la importancia de la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfatos de la rizosfera para mejorar la solubilización del fósforo fijado al suelo para que el mismo se encuentre disponible para la planta traduciéndose en un mayor rendimiento.

La producción de la enzima fosfatasa está controlada por mecanismos regulatorios complejos, de manera que la actividad de estas es detectable sólo bajo condiciones ambientales específicas y el interés por las enzimas fosfatasas ha ido incrementándose durante la última década debido a su gran aplicación en la biotecnología, aunque los conocimientos en cuanto a sus propiedades, regulación y rol que desempeñan es aún escaso (Fernández y Rodríguez, 2005).

Es así como en los sistemas de pH bajos se produce de manera natural este transporte por lo que la actividad fosfatasa medible podría disminuir si el sistema se encuentra suplementado con *A. brasilense*. La fosfatasa es una enzima que se inhibe por su propio sustrato y presenta un límite de sustrato donde aumenta su actividad, luego disminuye. Esto se demuestra en la Figura 4, en el tratamiento 5, consistente en semillas tratadas con *A. brasilense* más aplicaciones foliares (Az+1F).

Por ende, Henríquez *et al.* (2014) reportan una relación inversa entre la actividad fosfatasa y el contenido de P disponible sugiriendo que dicha tendencia de inhibición se da cuando los contenidos de P disponible en el suelo son muy altos y podría ocurrir cerca de la rizósfera en condiciones de fertilización fosfórica reciente.

## Conclusiones

Los resultados del experimento permitieron concluir que la inoculación de semillas de arroz con cepas de *Azospirillum brasilense* y su aplicación foliar no mejoró la longitud de raíces, masa seca de raíces y partes aéreas observadas al final del período de desarrollo del cultivo. La aplicación de cobalto más molibdeno en el tratamiento de semillas de arroz propició una mayor longitud de raíces en las plantas de arroz respecto al tratamiento que integraban semillas inoculadas con *A. brasilense* más dos aplicaciones foliares del mismo.

La actividad enzimática fosfatasa presentó valores más elevados en los tratamientos que contenían semillas inoculadas con *A. brasilense* respecto a aquellas que carecían del mismo, como el control (testigo absoluto) y el tratamiento dos (T2) con cobalto más molibdeno.

## Literatura citada

- Askary, M.; Mostajeran, A.; Amooaghaei, R. and Mostajeran, M. 2009. Influence of the Co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K Content of *Triticum aestivum* (cv. Baccros and Mahdavi). American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 5(3):296-307.
- Bali, M. and Mukerji, K. G. 1991. Interaction between VA mycorrhizal fungi and root microflora of jute. Dev. Agric. Manage. For. Ecol. 24(1):396-401.
- Becerra, J. M.; Quintero, D.; Martínez, M. and Matiz, A. 2011. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev. Colomb. Cienc. Hortíc. 5(2):195-208.
- Bécquer, G. C. J.; Lazarovits, G.; Nielsen, L.; Quintana, M.; Adesina, M.; Quigley, L.; Lalin, I. and Ibbotson, C. 2012. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase II: invernadero. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 51(3):985-997.
- Brito, T.; Schons, D.; Ritter, G.; Netto, L.; Eberling, T.; Pan, R. and Guimarães, V. 2018. Growth Promotion by *Azospirillum brasilense* in the Germination of Rice, Oat, Brachiaria and Quinoa. J. Exp. Agric. Inter. 22(1):1-9.
- Bouillant, M. L.; Miche, L.; Ouedraogo, O. L. M.; Alexandre, G.; Colette, J.; Sallé, G. and Bally, R. 1997. Inhibition de la germination des graines de *Striga* associe une augmentation de la croissance du sorgho par des bactéries du sol C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences. 320(1):159-162.
- Dalurzo, H. C.; Toledo, D. M. y Vázquez, S. 2000. Actividad de la fosfatasa ácida con diferentes usos del suelo en Eutródicos del sur de Misiones (Argentina). Venesuelos. 8(1):24-28.
- Dartora, J.; Guimarães, V. F.; Marini, D. and Sander, G. 2013. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. Bras. Eng. Agríc. Amb. 17(10):1023-1029.
- Díaz, F. A. and Ortegón, M. A. S. 2006. Efecto de inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización química en el crecimiento y rendimiento de canola (*Brassica napus*). Rev. Fitotec. Mex. 29(1):63-67.
- Díaz-Zorita, M.; Baliña, R. M.; Fernández-Canigia, M. V. and Peticari A. 2006. Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasilense*. Inpofos Informaciones Agronómicas. 29(1):17-19.

- Fernández, M. T. y Rodríguez, H. 2005. El papel de la solubilización de fósforo en biofertilizantes microbianos. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*. 39(3):27-34.
- García, F.; Muñoz, H.; Carreño, C. and Mendoza, G. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. Y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. 'arroz' en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*. 1(2):107-116.
- Gori, A. and Favilli, F. 1995. First results on individual and dual inoculation with *Azospirillum* - *Glomus* on wheat. *In: Azospirillum VI and Related Microorganisms, Genetics - Physiology- Ecology*. (Eds.). Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J. and De Zamaroczy, M. G37. Nato Asi Series, Series G: Ecological Sciences, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. 245-249 pp.
- Henríquez, C.; Uribe, L.; Valenciano, A. and Nogales R. 2014. Actividad enzimática del suelo- deshidrogenasa, B-glucosidasa, fosfatasa y ureasa- bajo diferentes cultivos. *Agron. Costarric*. 38(1):43-54.
- Ibarra-Puón, J. C.; Aguirre-Medina, J. F.; Ley-de Coss, A.; Cadena-Iñiguez, J. and Zavala-Mata, G. A. 2014. *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner inoculado con micorriza y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 20(2):201-213.
- Kussell, E; Kishony, R<sup>†</sup>; Balaban, N. Q. and Leibler, S. 2005. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*. 169(4):1807-1814.
- López, O.; González, E.; Llamas, P.; Molinas, A.; Franco, E.; García, S. y Ríos E. 1995. Estudio de reconocimiento de suelos, capacidad de uso de la tierra y propuesta de ordenamiento territorial preliminar de la Región Oriental del Paraguay. *MAG/SRNMA/BM/PRUT*. Asunción, Paraguay. 197 p.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, UK. 889 p.
- Martínez-Gallegos, V.; Bautista-Cruz, A. and Robles, C. 2007. Respuesta de las fosfatasa en la rizósfera de *Agave angustifolia* Haw. A la fertilización órgano-mineral. *Naturaleza y Desarrollo*. 10(1):28-45.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2018. Dirección de censos y estadísticas agropecuarias Síntesis estadísticas producción agropecuaria año agrícola 2017/2018 informe-noviembre 2018. San Lorenzo, Paraguay. 50 p.
- Nahas, E. 2007. Phosphate solubilizing microorganisms: effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. *In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer Netherlands. 1(1):111-115.
- Paz-Ferreiro, J.; Trasar-Cepeda, C.; Leirós, M. C.; Seoane, S. and Gil-, F. 2007. Biochemical properties of acid soils under native grassland in a temperate humid zone. *New Zealand J. Agric. Res*. 50(4):537-548.
- Rodríguez, M. A.; Lozano, Z.; González, P.; Rodríguez, S.; Caballero, R. and Delgado, D. 2012. Actividad enzimática como indicador temprano de calidad en un suelo de sabana bajo manejo conservacionista. *Venezuelos*. 21(1):21-31.
- Salgado, B. I.; Cruz, A. M.; Durán, D. M. Del C.; Oviedo, R.; Carballo, V. M. E. and Martínez, S. A. 2010. Bacterias como herramientas potenciales en el mejoramiento de humedales artificiales para el tratamiento de aguas. *Revista CENIC. Cienc. Biol*. 41(1):1-10.
- Salvagiotti, F; Bacigaluppo, S.; Enrico, J. M.; Manlla, A.; Pagani, R.; Gentili, O.; Albrecht, R.; De Emilio, M.; Gerster, G.; Méndez, J. M.; Malmantile, A.; Prieto, G. and Capurro, J. 2014. Fertilización con cobalto y molibdeno en soja. Para mejorar la producción 52. INTA Estación Experimental Agropecuaria Oliveros. Centro Regional Santa Fe. <https://inta.gob.ar/documentos/fertilizacion-con-cobalto-y-molibdeno-en-soja-1>.

- Santos Da, S. M.; Neumann, V.; De Mello-Scalcon, R. and Zdruikoske, C. 2013. Efeitos do molibdênio e cobalto na germinação e desenvolvimento de plântulas de arroz em baixas temperaturas. Capa. 5(2). <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/66066>.
- Sims, J. L. 1996. Molybdenum and cobalt. Methods of soil analysis part 3. ÇöChemical Methods sssabookseries. 723-737 pp.
- Vogel, G. F.; Martinkoski, L.; Ruzicki, M. 2014. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: importâncias e resultados. Agropecuária Científica no Semi-Árido. 10(1):01-06.
- Van den Broek, D.; Bloemberg, G. v and Lugtenberg, B. 2005. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas bacteria*. Environ Microbiol. 7(11):1686-1697.
- Veeraswamy, J. T; Padmavathi and K. Venkateswarlu. 1992. Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. Indian J. Microbiol. 32(1):305-308.