

## BACTERIAS DE VIDA LIBRE FIJADORAS DE N<sub>2</sub> EN DOS SUELOS DEL VALLE DEL CAUCA<sup>1</sup>

Sigifredo Cardona M.<sup>2</sup> - Marina Sánchez de Prager<sup>3</sup>

### COMPENDIO

Con el fin de establecer la presencia de bacterias de vida libre fijadoras de N<sub>2</sub> e identificar las especies predominantes, se recolectaron muestras en dos suelos agrícolas del Valle del Cauca ubicados en Palmira y en Ricaurte. Se les realizó caracterización física, química y se recogió información acerca de su manejo anterior. En cada muestra se efectuó conteo de fijadores asimbióticos de N<sub>2</sub> mediante el método de diluciones y siembra en medio Ashby libre de nitrógeno. El aislamiento bacteriano predominante se purificó e identificó. Las condiciones físico-químicas de ambos suelos favorecen la presencia de estos microorganismos, pues tienen pH cercano a la neutralidad y contenido adecuado de nutrimentos. En el suelo de Ricaurte, inceptisol moderadamente profundo, cultivado con maracuyá y de uso intensivo de agroquímicos, se estimó una población de 5.5 x 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias/g de suelo seco y se aisló *Azotobacter* como cepa predominante (posiblemente *A. chroococcum*, según IMI). En el suelo de Palmira, mollisol cultivado con tomate, la población fue de 5.1 x 10<sup>7</sup> U.F.C/g suelo seco y predominó *Stenotrophomonas maltophilia* (IMI), conocida como promotora de crecimiento en girasol y trigo, registrada en algunos casos como patógena débil en humanos.

**Palabras claves:** Fijadores asimbióticos de N<sub>2</sub>, *Azotobacter* spp, *Stenotrophomonas maltophilia*

### ABSTRACT

#### N<sub>2</sub> FIXER FREE LIVING BACTERIA IN TWO SOILS OF CAUCA VALLEY

Several soil samples were taken in two agricultural soils, located in Palmira and Ricaurte, Cauca Valley, with the aim of establishing the presence of free life N<sub>2</sub> fixer bacteria and to identify the predominant species. Such soils were chemical and physically characterized and was collected information about their farmer management. For each one of them were counted the N<sub>2</sub> asymbiotic fixers by the dilution method and culture in N free Ashby media. The main bacteria isolated in each soil were, purified and identified. The physical chemistry conditions in both soils favored the presence of such microorganisms because of the pH, closer to neutral and an adequated nutrient content. In Ricaurte, the soils was an inceptisol, moderately deep and growing Passion fruit - *Passiflora edulis* Sims -, in which have had an intensive use of chemicals, similar to Palmira's soil; there, the microbial population was 5.5 x 10<sup>7</sup> U.F.C N<sub>2</sub> fixer bacteria/g of dry soil. In Palmira, it was a mollisol growing tomato - *Lycopersicon esculentum* Mill - with a population of 5.1 x 10<sup>7</sup> U.F.C/g of dry soil; both figures indicated the abundance of such microbiological resource and the potential for being explored in sustainable agricultural systems. In Ricaurte it was isolated *Azotobacter* as a main strain (probably *A. chroococcum*, according IMI) and in Palmira, *Stenotrophomonas maltophilia* (IMI), well known as a growth promoter in wheat and sunflower, referred in some cases as lightly pathogen in humans.

**Key words:** N<sub>2</sub> asymbiotic fixers, *Azotobacter chroococcum*, *Stenotrophomonas maltophilia*

### INTRODUCCION

El alto costo y bajo suministro de fertilizantes nitrogenados, cuya fuente primaria de energía son los combustibles fósiles finitos, encarecen los costos de producción, ocasionan efectos negativos sobre el ambiente y hacen prever una situación económica y social difícil hacia las próximas décadas, caracterizadas

por incrementos en el crecimiento demográfico, especialmente en los países en vías de desarrollo.

El N<sub>2</sub> molecular constituye entre el 78% y 80% de la atmósfera y sólo es asimilable para las plantas a través de su reducción industrial con alto consumo de energía fósil no renovable, o a través de la actividad de diferentes microorganismos de la rizosfera y del filo plano.

<sup>1</sup> Trabajo de investigación financiado por Estampilla Pro-Universidad. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira; <sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira; <sup>3</sup> Profesora Titular. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, A.A 237- Email: pragersa@colnet.com.co

La fijación biológica de  $N_2$  en forma asimbiótica, contribuye gratuitamente entre 22 y 56 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, aproximadamente el 50% del nitrógeno necesario para las plantas, reduce los requerimientos de fertilizantes industriales y por tanto disminuye los costos de producción agrícola. Aunque las cifras son considerablemente inferiores a las obtenidas por simbiosis, la amplia distribución de las bacterias asimbióticas y su participación en la síntesis de sustancias biológicamente activas, son la base de su gran importancia (Primavesi, 1984; Arias, 1986; Martínez, 1986; Fernández y Novo, 1988; López, 1993).

La familia *Azotobacteriaceae* comprende los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Azomonas*, *Azotococcus* (Postgate, 1982); bacterias aerobias, heterotróficas y fijadoras asimbióticas de  $N_2$ . Buchanan y Gibbons, (1974); Thompson and Skerman (1979); Arias (1986); Holt et al (1994).

El género *Azotobacter* se distingue por su forma de bacilo, sus células son grandes de 2-3 $\mu$  x 2-6 $\mu$ , alargadas o aplanadas, redondas u ovaladas, algunos autores las consideran pleomórficas; son Gram negativas, móviles con flagelación peritrica o polar y aerobias obligadas. No presentan endosporas pero en ciertas condiciones, como la presencia de butanol y/o betahidroxibutirato, forman quistes esféricos que capacitan a la célula para vivir en épocas secas y sobrevivir a las radiaciones durante su dispersión de un suelo a otro, a través del aire; a pesar de ello, no son muy resistentes al calor. La cantidad de quistes formados depende de la fuente de carbono del medio. (Brock, 1973; Arias, 1986).

*Azotobacter* requiere humedad y aireación adecuadas, crece en presencia de nitrógeno combinado, pero éste impide la fijación de  $N_2$ . Presenta la mayor velocidad de respiración de todos los seres vivos (velocidad de consumo de  $O_2$ ). La eficiencia de fijación de  $N_2$  en *Azotobacter* es del 1 al 2%, o sea que fija de 10 - 20 mg de  $N_2$  por gramo de fuente de carbono consumida, aunque en casos excepcionales *A. chroococcum* fija de 20 a 30 mg de  $N_2$  por cada gramo de glucosa que consume. (Buchanan y Gibbons, 1974; Thompson and Skerman, 1979; Yague, 1983; Arias, 1986; Martínez, 1986; Fernández y Novo, 1988).

En el suelo, *Azotobacter* crece bien en ambientes con abundante materia orgánica, cantidades óptimas de fósforo y potasio, temperatura entre 28 y 30°C, presencia de una fuente de energía principalmente manitol, disponibilidad de calcio, magnesio y molibdeno, aunque este último puede ser sustituido por el vanadio. El pH óptimo para su desarrollo está entre 6.5 y 7.5, sin embargo, se ha encontrado *Azotobacter* en suelos con

pH desde 4.5 hasta 8.5. En suelos salinos, la población de *Azotobacter* es 1000 veces menor que en suelos fértiles y su desarrollo se ve inhibido por aumentos en la concentración de cloruro de sodio (Cervantes y Olivares, 1976).

Además de fijar  $N_2$ , *Azotobacter* produce vitaminas, auxinas (AIA), giberelinas, citocininas y otras sustancias que estimulan el crecimiento y producción vegetal; fuera de ello, estas bacterias actúan como antagónicas de algunos hongos fitopatógenos como *Fusarium sp*, *Colletotrichum sp* y *Pythium sp*. (Yague, 1983; Primavesi, 1984; González et al, 1985; Martínez, 1986; Siqueira y Franco, 1988; Shabaev et al, 1989).

Estos hechos evidencian la necesidad de explorar alternativas que potencien el manejo de la fijación biológica de  $N_2$  como agenciadora de la fertilidad del suelo, campo en el que se ha avanzado bastante en España, Dinamarca, Cuba y La India. En Colombia la investigación sobre la fijación biológica de  $N_2$  se ha concentrado en la simbiosis Rizobios - leguminosa, dejando de lado un sector no menos importante como son los fijadores asimbióticos de  $N_2$ . El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de estos habitantes naturales de los suelos, que colaboran con la nutrición y sanidad de los cultivos; para ello se definieron los siguientes objetivos:

- Estimar las poblaciones de bacterias fijadoras de  $N_2$  en dos suelos del Valle del Cauca.
- Aislar, purificar y caracterizar la cepa predominante en cada uno de estos suelos.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Caracterización de los suelos

La muestra No. 1 se tomó en un lote de la Hacienda El Cairo, localizada en el corregimiento de Ricaurte, Municipio de Bolívar-Valle, situado a 940 msnm y con una temperatura media anual de 26°C; la muestra No. 2 se tomó en un lote ubicado en la zona rural del municipio de Palmira - Valle a 1001 msnm y una temperatura promedio de 26°C (IGAC, 1980). Se efectuó caracterización física y química para cada suelo y se indagó sobre las condiciones de manejo de cada uno ellos.

### Estimación de microorganismos fijadores de $N_2$

En cada lote se escogieron cinco sitios de muestreo; en los primeros 20 cm de profundidad se tomaron aproximadamente 200 g de suelo/sitio, retirando previamente la capa superficial (hojarasca y materia orgánica semi-descompuesta). Las muestras se dejaron secar al aire libre, se mezclaron, homogenizaron y

pasaron por tamices de 2 y 0.85 mm respectivamente y se almacenaron para las observaciones a realizar. En los primeros 5 días después del muestreo, se hicieron estimaciones de microorganismos fijadores de N<sub>2</sub>.

Para ello se usó el método de diluciones: a partir de 10<sup>-3</sup> hasta 10<sup>-9</sup> se efectuaron siembras en cajas de Petri con medio Ashby (el cual contiene sales de Ca, Na, K, S, Mg y una fuente de carbono manitol, además está libre de nitrógeno), a razón de tres repeticiones por dilución; se incubaron a 30°C por espacio de 24, 48 y 72 horas, al cabo de las cuales se efectuaron los conteos. (Sánchez, 1990; Holt et al, 1994).

### Caracterización de cepas

Las etapas de aislamiento, purificación, caracterización e identificación de las cepas se

y manitol. (Llanos y Sánchez, 1982; Holt et al., 1984). Posteriormente las cepas se enviaron al International Micrological Institute - IMI en Inglaterra, con el fin de confirmar su identificación.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Caracterización de los suelos estudiados

Ricaurte corresponde a un inceptisol (VERTIC USTROPEPT) del conjunto Ricaurte; el suelo de Palmira corresponde a un mollisol (PACHIC HAPLUSTOLL). (IGAC, 1980). El lote de Ricaurte estaba sembrado con maracuyá y el de Palmira con tomate, ambos con alto uso de insumos químicos (Cuadro 1)

El pH del suelo de Ricaurte, está en el rango óptimo para el crecimiento de fijadores de N<sub>2</sub> del género

**CUADRO 1. Localización, clasificación taxonómica y uso de los suelos estudiados**

| Conjunto                       | Ricaurte (RT)                                  | Palmira (PLA)   |
|--------------------------------|--|---|
| Clasificación taxonómica       | VERTIC USTROPEPT                               | PACHIC HAPLUSTOLL                                       |
| Características sobresalientes | Suelos superficiales a moderadamente profundos | Horizontes poco diferenciados profundos a muy profundos |
| Cultivo anterior               | Barbecho                                       | Barbecho  |
| Cultivo actual                 | Maracuyá                                       | Tomate  |
| Uso de insumos químicos        | Intensivo                                      | Intensivo   |

efectuaron en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia Palmira.

El aislamiento de las cepas bacterianas fijadoras de N<sub>2</sub>, se hizo por siembra de gránulos de suelo en cajas de Petri con medio Ashby, se sembraron 3 réplicas por cada muestra de suelo y se incubaron a 30°C por 48 horas. Girard y Rougieux (1964). Una vez obtenidas las colonias, se sometieron a un proceso sucesivo de diluciones sobre agua destilada estéril hasta lograr la purificación de las cepas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa anterior, se establecieron los cultivos puros de las bacterias en tubos de ensayo, sobre el medio de cultivo mencionado.

De cada muestra de suelo se seleccionó la cepa que presentara mayor población en los aislamientos. Con el fin de tener una aproximación a su identificación, se realizaron algunas pruebas morfológicas y bioquímicas tales como crecimiento aeróbico, tinción de Gram, tinción negativa, producción de catalasa, licuefacción de gelatina, producción de H<sub>2</sub>S a partir de peptona, crecimiento en caproato y O/F sobre glucosa, lactosa

*Azotobacter* (6.5-7.5), mientras que Palmira presenta un pH más bajo, aunque no limitante para su desarrollo (Cuadro 2). El contenido de materia orgánica del suelo de Ricaurte es bajo, tal vez debido a las altas temperaturas, la presencia de vientos secos y baja precipitación, predominante en la zona, o sea su carácter ustico. Se esperaría, por ello, que en este suelo la población de *Azotobacter* fuera baja. La materia orgánica de Palmira está dentro del rango normal para los suelos del Valle del Cauca, por lo que se espera buena disponibilidad de carbohidratos que faciliten el crecimiento y multiplicación de estas bacterias fijadoras. Ambos suelos tienen alto contenido de P, especialmente en Palmira, que duplica la cantidad presente en Ricaurte. El pH cercano a la neutralidad en Ricaurte, aparentemente hace disponible este elemento para las plantas; en Palmira, puede ocurrir que parte del fósforo esté fijado al suelo. En cuanto a los niveles de cationes intercambiables, el K y Ca se encuentran altos para los dos suelos, siendo superiores en Palmira; el Mg y el Na están dentro del rango normal para ambos, al igual que la CIC.

CUADRO 2. Caracterización físico-química y biológica de los suelos estudiados

| SUELO                                       | RICAUORTE             | PALMIRA               |
|---|-----------------------|-----------------------|
| PH (RELACION 1:1)                           | 6.9                   | 6.0                   |
| M. ORGANICA (%)                             | 1.00                  | 4.3                   |
| Al. Intercambiable meq/100g                 | -                     | -                     |
| P. asimilable ppm                           | 54                    | 103                   |
| K. intercambiable meq/100g                  | 0.59                  | 0.82                  |
| Ca. Intercambiable meq/100g                 | 8.5                   | 11.8                  |
| Mg. Intercambiable meq/100g                 | 6.7                   | 7.10                  |
| Na intercambiable meq/100g                  | 0.27                  | 0.25                  |
| CIC. (meq/100g)                             | 18.2                  | 23.4                  |
| Cobre (ppm).                                | 6.8                   | 13.6                  |
| Hierro (ppm).                               | 29.7                  | 47.0                  |
| Manganeso (ppm)                             | 35.0                  | 40.5                  |
| Zinc (ppm).                                 | 1.3                   | 3.7                   |
| Boro (ppm).                                 | 0.1                   | 0.0                   |
| Textura al tacto.                           | ArA                   | FArA                  |
| Estimación de fijadores de N <sub>2</sub> . | 5.5 * 10 <sup>7</sup> | 5.1 * 10 <sup>7</sup> |

Con respecto a los elementos menores, el Cu y el Mn están altos para los dos casos, y el Fe se encuentra en un rango medio; el Zn está bajo en el suelo de Ricaurte y alto en Palmira, mientras que B es bajo para ambos suelos.

Con relación a la parte física la textura de los dos suelos es relativamente pesada; aunque aparentemente hay mejores características en Palmira, en épocas secas se alcanza a apreciar la formación de grietas.

#### Estimación de microorganismos fijadores de N<sub>2</sub>

En los suelos de Ricaurte y Palmira se estimaron poblaciones de 5.5 X 10<sup>7</sup> y 5.1 X 10<sup>7</sup> U.F.C. gss<sup>-1</sup> respectivamente, los cuales superan los registros en otros suelos (Burbano, 1989), y señala la riqueza en este recurso biológico, a pesar de corresponder a agrosistemas con alto uso de insumos químicos (Cuadro 2).

#### Caracterización de los aislamientos bacterianos

La cepa B<sub>1</sub> corresponde a una bacteria aeróbica, fijadora de nitrógeno, color blanquecino inicialmente, que luego se torna café oscuro. Consta de células muy pequeñas de forma ovoides y cocoides; su mayor velocidad de crecimiento se manifiesta dentro de las 24 y 48 horas, aunque en este tiempo no cubre completamente la superficie del medio de cultivo.

La cepa B<sub>2</sub> también es una bacteria aeróbica fijadora de nitrógeno, de apariencia transparente cuando joven,

que al envejecer toma un color café oscuro, formas ovoides y cocoides, tamaño un poco mayor que B<sub>1</sub>, mayor velocidad de crecimiento durante las primeras 48 horas, tiempo en el que cubre casi totalmente la superficie del medio de cultivo.

Las cepas son Gram negativas, con tendencias a Gram variables, catalasa y proteasa positivas, producción de H<sub>2</sub>S positiva, aeróbicas estrictas y en esta condición utilizan como fuentes de carbohidratos azúcares tales como glucosa, lactosa y manitol. (Cuadro 3)

El caproato permite diferenciar a *Azotobacter chroococcum* del resto de especies del género, pues sólo ésta y *Azotobacter vinelandii* crecen sobre dicho azúcar, pero sólo la segunda produce pigmentos verdes fluorescentes solubles en agua. Las cepas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> crecieron en caproato (Holt et al., 1994).

Los resultados de estas pruebas condujeron a que ambas cepas fueran identificadas en primera instancia como pertenecientes al género *Azotobacter*. El IMI (International Mycological Institute 1996), con base en el análisis cuantitativo de ácidos grasos, confirmó a la cepa B<sub>1</sub> como *Azotobacter* sp, sugiriendo que probablemente se trate de *A. chroococcum* por ser esta la especie más comúnmente aislada. Con respecto a B<sub>2</sub>, fue identificada por IMI como *Stenotrophomonas maltophilia*. Esta bacteria ha sufrido continuas reclasificaciones: *Pseudomonas maltophilia*,

CUADRO 3. Algunas características morfológicas y fisiológicas de las cepas seleccionadas

| PRUEBA  | CEPA   |  | OBSERVACION   |
|---|--|--|---|
|   | B1   | B2   |   |
| Tinción de Gram                                       | - y +  | - y +  | Gram variables  |
| Tinción negativa                                      | Células cocoides y ovoides                         | Células cocoides y ovoides                         |   |
| Crecimiento aeróbico                                  | +  | +  |   |
| Crecimiento anaeróbico                                | -  | -  |   |
| Producción catalasa. (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | +  | +  | B2 > B1   |
| Licuefac. Gelatina. (Proteasa)                        | +  | +  | B2 > B1   |
| Producción de H <sub>2</sub> S a partir de peptona    | +  | +  | Formac. de sulfuro de plomo (PbS) al contacto con el acetato de plomo |
| O/F -Glucosa  | Degrada en condiciones aeróbicas                   | Degrada en condiciones aeróbicas                   | Aeróbicas   |
| -Lactosa  | Degrada en condiciones aeróbicas aunque lentamente | Degrada en condiciones aeróbicas aunque lentamente |   |
| -Manitol  | Degrada en condiciones aeróbicas                   | Degrada en condiciones aeróbicas                   |   |
| CREC. EN MANITOL                                      | +  | +  |   |
| CREC. EN CAPROATO                                     | +  | +  | B2>B1   |
| IDENTIFICACION PRELIMINAR                             | <i>Azotobacter chroococcum</i> B <sub>1</sub>      | <i>Azotobacter</i> B <sub>2</sub>                  |   |
| IDENTIFICACION IMI                                    | <i>Azotobacter</i> sp                              | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                |   |

*Xanthomonas maltophilia* y finalmente Palleroni y Bradbury 1993, la situaron como *S. maltophilia*. Miembros de esta especie se han encontrado en un amplio rango de hospederos vegetales, y se ha utilizado como promotores de crecimiento en girasol y trigo; sin embargo, se ha registrado en algunos casos como patógeno débil en humanos (Fages y Arsac, 1991).

Los resultados evidenciaron la presencia de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> de vida libre en los lotes muestreados y las cantidades estimadas indican la riqueza de este recurso microbiológico y las potencialidades a explorar, dentro de sistemas de agricultura sostenible.

## BIBLIOGRAFIA

ARIAS O., D. (1986). Introducción al estudio de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico por la asociación *Paspalum notatum* - *Azotobacter* sp. en dos sitios del Valle del Cauca. Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia. p. 18-24.

BROCK, T. D. (1973) Biología de los microorganismos. Barcelona: OMEGA. p. 620-622.

BUCHANAN, R. E y GIBBONS, N. E. (1974) Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 th ed. Baltimore : Williams and Wilkins. p. 217-248, 253-255.

BURBANO, H. (1988) El Suelo: una visión sobre sus componentes biogénicos. Pasto: Universidad de Nariño. p. 425. (Serie de Investigaciones, No 1.)

A bajos niveles de P en el suelo, la inoculación de pimentón con cepas efectivas de HMA, mejora el crecimiento de las plantas, la absorción de P, Zn, Mn, Cu, la floración, reduce el tiempo de antesis, incrementa la producción de materia seca total, el rendimiento y el nivel de ácido ascórbico de la fruta. Las plantas de pimentón micorrizadas soportan mejor las condiciones de salinidad (Gómez & Sánchez de P., 1991). Plantas de pimentón preinoculadas con *Glomus fasciculatum* y fertilizadas con 37.5 kg P ha<sup>-1</sup> presentaron mayores rendimientos que aquellas no inoculadas que recibieron 75 kg. P ha<sup>-1</sup>. Esta información sugiere que la aplicación de fertilizantes se puede reducir a través de la inoculación con una cepa eficiente de HMA, lo cual incide en los costos de fertilización sin detrimento del rendimiento (Sreelamulu & Bagyara, 1984).

Son numerosos los registros de efectos positivos ocasionados por la inoculación con *Azotobacter* en maíz, avena, trigo, sorgo, pasto, etc. Por ejemplo, en Pakistán, Hussain et al (1987) informaron que al aplicar *Azotobacter* a semillas de maíz sembradas en campo con y sin fertilización (N y P a razón de 125 y 40 kg.ha<sup>-1</sup>), el incremento en el rendimiento de grano fue de 19.6 y 15.9% en comparación con el control no inoculado. El efecto fue mayor en condiciones de no fertilización. Este aumento lo explican con base en la fijación de N<sub>2</sub> por esta bacteria y la posible producción de hormonas de crecimiento como ácido indolacético (auxina), ácido giberélico (giberelina) y kinetina (citocinina). Martínez-Toledo et al (1988) encontraron que la inoculación con *Azotobacter chroococcum* fue más eficiente con dosis bajas (40 kg. N ha<sup>-1</sup>) que con dosis altas (80 kg. N ha<sup>-1</sup>) de úrea.

Aguilar, Tofiño & Sánchez de P. (1995) aislaron dos bacterias de la rizosfera de guanábano, cítricos y garbanzo, identificadas preliminarmente como *Azotobacter spp.*, inocularon semillas de tomate, con estos cultivos bacterianos puros de 48 h de siembra, diluidos en agua, aplicados mediante imbibición durante una hora y también por aplicación directa de inóculo a la raíz de plántulas de 15 días de siembra. Obtuvieron mayor crecimiento y área foliar en las plántulas donde se imbibieron las semillas.

Sánchez et al (1994) evaluaron la combinación de cuatro cepas de hongos micorrizógenos con niveles de *Azotobacter* en *Coffea arabica* L. A los siete meses, la combinación de *Glomus fasciculatum* y *G. pelucida* con la rizobacteria, mostró los mayores incrementos en altura, diámetro del tallo y área foliar. En pimentón, Tofiño & Sánchez de P. (1996), evaluaron tres inóculos de HMA y *Azotobacter vinelandii* aplicados a la semilla individualmente y combinados. Las plantas inoculadas con HMA (*Scutellospora gilmorei* y *Acaulospora longula*)

superaron en 100% el volumen de raíz respecto al testigo, *Azotobacter sp.* logró aumento del 75%; y la interacción HMA-*Azotobacter*, aunque difirió significativamente del testigo, fue inferior a la acción individual de estos microorganismos. Efectos similares se presentaron en peso seco de raíces.

En este trabajo de investigación se planteó como hipótesis que la combinación micorriza - rizobacterias diazotróficas inoculadas al pimentón pueden incrementar su rendimiento y sustituir la mitad de la dosis de fertilizante de síntesis. Para comprobar su validez, se plantearon como objetivos:

- Estimar los posibles efectos de la inoculación con HMA en el rendimiento del pimentón *Capsicum annuum* L. y sus componentes principales peso de frutos y número de frutos.
- Estimar el efecto de la inoculación con rizobacterias diazotróficas en la producción de la planta.
- Estimar los efectos de interacción HMA - rizobacterias diazotróficas en la expresión del rendimiento y los dos componentes principales mencionados.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El experimento se llevó a cabo en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Departamento del Valle del Cauca.

Se establecieron siete tratamientos :

- |  |        |
|--|--------|
| 1 Fertilización NPK (18-18-18), (40 g/pl.) | F      |
| 2 Fertilización NPK (18-18-18), (20 g/pl.) | F/2    |
| 3 Bacteria # 1 + NPK (20 g/pl.)            | B1F/2  |
| 4 Bacteria # 2 + NPK (20 g/pl.)            | B2F/2  |
| 5 HMA + NPK (20 g/pl.)                     | MF/2   |
| 6 HMA + Bacteria # 1 + NPK (20 g/pl.)      | MB1F/2 |
| 7 HMA + Bacteria # 2 + NPK (20 g/pl.)      | MB2F/2 |

Las cepas bacterianas se aislaron con anterioridad, en el lote donde se realizó el ensayo, a partir de suelo de la rizosfera de cítricos, garbanzo y guanábano. La rizobacteria B1 que se identificó preliminarmente como *Azotobacter chroococcum*, mostró efecto promotor de crecimiento en tomate (Aguilar, Tofiño & Sánchez de P., 1996) y la rizobacteria B2, *A. vinelandii*, provocó incremento en el desarrollo de plántulas de tomate y pimentón (Aguilar, Tofiño & Sánchez de P., 1996; Tofiño & Sánchez de P., 1996).

El inóculo de HMA correspondió a una mezcla de *Scutellospora gilmorei* y *Acaulospora longula*, se obtuvo en el banco de cepas de la UNal-Palmira, se escogió

por haber promovido mayor crecimiento en pimentón en ensayos previos. (Tofiño & Sánchez de P. 1996). El material vegetal empleado fue la variedad California Wonder.

Para inocular las semillas con rizobacterias, se imbibieron una hora en medio Ashby líquido, empleando  $1 \times 10^7$  bact/ml (Martínez-Toledo et al, 1988 y Aguilar, Tofiño & Sánchez de P, 1996). Para inocular la semilla con HMA, se rodeó del suelo micorrizado; se utilizaron 200 esporas/pl. En los tratamientos que combinaban las dos inoculaciones, primero se imbió la semilla en solución bacteriana por una hora y se aplicó HMA al momento de la siembra.

Los semilleros se hicieron en vasos desechables utilizando como sustrato cachaza - carbonilla (3:1), a los 40 días se llevaron al campo. En el trasplante se utilizó surco doble, a 1 m, con una distancia entre plantas de 0.4 m., lo que dio una población estimada de 42.000 pl/ha. La fertilización se efectuó 15 días después del trasplante.

El área total de cultivo (188 m<sup>2</sup>) se distribuyó en 4 bloques completos, las unidades experimentales estaban constituidas por parcelas de 6.7 m<sup>2</sup> con cuatro surcos de siete plantas cada uno y una parcela útil con los dos surcos centrales, se eliminó una planta en las cabeceras para un total de 10 plantas por repetición, sobre las cuales se realizaron todas las observaciones.

Durante tres meses en cosechas semanales se evaluó el número de frutos/planta, peso promedio de frutos/planta y rendimiento por planta. Para determinar el efecto de los tratamientos, se realizó análisis de varianza para cada una de las variables y la prueba de rango múltiple de Duncan al 5% de probabilidad de error.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Número de frutos por planta

Se presentaron diferencias significativas entre las plantas micorrizadas + F/2, aquellas a las que se les aplicó solamente F/2 y B2F/2. La inoculación de *Scutellospora* y *Acaulospora* + F/2 produjo el mayor número de frutos por planta (9), superó a la fertilización media (F/2) y fertilización completa (F) en 48% y 12% respectivamente y los tratamientos con las rizobacterias B1 y B2 + F/2 (Figura 1).

En la combinación micorriza-rizobacterias disminuyó el número de frutos respecto a MF/2; B1 se vió afectada negativamente por la interacción, en cambio B2 incrementó sus frutos y no se diferenció significativamente del tratamiento MF/2, aunque tampoco de su respuesta cuando se inoculó sola.

Es importante tener en cuenta que en las relaciones que se establecen entre los microorganismos en la rizosfera de cultivos influye el genotipo de cada uno de ellos, su capacidad de competencia y las condiciones ambientales, entre otros (Barea & Azcón-Aguilar, 1979).

### Peso promedio de frutos

Para esta variable, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, aunque las inoculaciones individuales o combinadas aumentaron el peso promedio de frutos en comparación con los testigos (F/2 y F), diferencias posiblemente debidas al error experimental.

B2F/2 fue el tratamiento donde se encontró el mayor peso promedio de frutos por planta y en FC el menor (Figura 2).

### Rendimiento por planta

Se presentaron diferencias altamente significativas entre tratamientos. Aquellos con inoculación microbiana + F/2 incrementaron el rendimiento con respecto a F/2. Fertilización completa (F) fue superado por MF/2, B1F/2 y MB2F/2 (Figura 3).

El mayor rendimiento se obtuvo en HMAF/2 con promedio de 970 g/planta y superó significativamente los demás tratamientos; a la fertilización completa en 15% y a F/2 en 81%. La presencia de micorriza hizo que la planta fuera más eficiente absorbiendo nutrientes, hasta el punto que con la dosis media de NPK (F/2) se alcanzó mayor número de frutos y rendimiento que en la fertilización completa (F) y en las combinaciones de F/2 + rizobacterias + micorriza.

B1F/2 y MB2F/2 superaron en 5 y 5.5% respectivamente el rendimiento obtenido por fertilización completa, sin embargo no difirieron significativamente. B2 y MB1F/2 presentaron rendimientos inferiores a fertilización completa. B1 alcanzó un rendimiento significativamente superior (21.6%) con respecto a B2, sin embargo en las interacciones con micorriza, disminuyó significativamente su actividad, mientras que B2 actuó sinérgicamente con HMA, no sólo en esta variable, sino también en número de frutos por planta.

Aguilar & Sánchez de P. (1998), inocularon la rizobacteria B1, utilizada en este trabajo, en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill Var. Santa Clara + fertilización media de NPK, esta combinación aumentó en 5% el peso promedio de frutos y rendimiento respecto a fertilización completa y media.

El análisis de correlaciones mostró que el número de frutos por planta tuvo alta influencia sobre el rendimiento del cultivo, mientras que a mayor peso promedio de frutos se presentó menor rendimiento.

**CUADRO 1. Distribución de la Producción de frutos de pimentón a través de tres meses de cosecha**

| TRAT.    | MES (%) |      |      | TOTAL (g/pl) |
|----------|---------|------|------|--------------|
|          | 1       | 2    | 3    |              |
| F        | 26.4    | 12.8 | 60.6 | 837.05       |
| F/2      | 20      | 18.1 | 61.9 | 533.2        |
| B1.F/2   | 41.9    | 6.8  | 51.2 | 877.78       |
| B2.F/2   | 27.3    | 25.8 | 46.8 | 721.77       |
| M.F/2    | 34.4    | 10.4 | 52.2 | 969.858      |
| M.B1.F/2 | 25.6    | 13.3 | 60.9 | 770.87       |
| M.B2.F/2 | 32.8    | 8.8  | 58.2 | 882.51       |

### BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, J. E.; SANCHEZ DE P. M. Efecto de una bacteria nitrificadora y niveles de fertilizante en el comportamiento agronómico del tomate *Lycopersicon esculentum* Var. Santa clara. En: Acta Agronómica. Vol 70, Oct-Dic. 1998. 15 p.
- AGUILAR, J. ; TOFIÑO, R; SANCHEZ DE PRAGER, M. Caracterización de dos cepas de *Azotobacter* sp. y evaluación de su efectividad en semillas de tomate. En : ASCOLFI INFORMA 22 (2): 1995. p30-34
- \_\_\_\_\_. Aislamiento, purificación e inoculación de dos cepas de *Azotobacter* sp. en semilleros de tomate *Lycopersicon esculentum* Línea promisionaria UNal Palmira. Boletín técnico. Vol. 7 : 1996 p. 28-45.
- BAREA, J.M; AZCON - AGUILAR, C. La rizosfera: Interacciones microbio-planta. Anales de Edafología y Agrobiología. Tomo XLI, Vol. 7-8, 1979 p 24.
- BROWN, C; THEODOROU, C. Interactions between bacteria and mycorrhizal fungi En: Soil Biol Biochem Vol. 11. 1979. p. 119-126
- GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis New Phytologist 128. 1994. p 197- 210.
- GOMEZ, E.; SANCHEZ DE P., M. Respuesta del pimentón *Capsicum annuum* a la inoculación con hongos MVA. Boletín técnico UNal Palmira Vol 2. (2) 1991. p. 103-122.
- HUSSAIN, A., ARSHAD, M., HUSSAIN, F. Response of maize *Zea mays* to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. En: Biology and Fertility of Soils Vol 4. 1987. p. 73-77
- LEE, K.G, PANKHURST, C.E. Soil organisms and sustainable productivity. En: Soil, biology and biochemistry. Vol 30. 1992. p. 855-892.
- MARTINEZ-TOLEDO, M.V; GONZALES, L., J ; DE LA RUBIA, T.; MORENO, J.; RAMOS-C., A. Grain yield response of *Zea Mays* (hybrid AE 703) to *Azotobacter chroococcum* H23. En: Biol. Fert. Soils Vol 6: 1988 p 352-353
- SANCHEZ, C. et al. Utilización de las micorrizas VA y *Azotobacter* en la producción de posturas en *Coffea arabica* L. En : Cultivos Tropicales. Vol. 15 N°3 1994. p. 69-70.
- SANCHEZ DE PRAGER, M. Las endomicorrizas como una alternativa para mejorar la absorción del fósforo Boletín Técnico, Vol 7 . Dic/96. 1996. p 18-26
- SREERAMULU, K ; BAGYARAJ, D. Field response of chili to VA mycorrhiza in black clayey soil. American conference on mycorrhizal, 6, 1984. Proceedings p. 320.
- TOFIÑO, R ; SANCHEZ DE P., M. Efecto de la interacción HMA - *Azotobacter* sp. en semilleros de pimentón *Capsicum annuum*. UNal Palmira. 1996. Problema Especial Inédito 20 p.
- WATERER, D ; COLTMAN , R. Effects of controlled release phosphorus and inoculum density on the growth and mycorrhizal infection on pepper and leek transplants. En: Hortscience. 23 83); 620-622.