

# Evaluación de la asociación bacterias fijadoras de nitrógeno - líneas interespecíficas de arroz-nitrógeno, en Typic haplustalf. Ibagué, Colombia

## Evaluation of the association nitrogen fixing bacterias interspecific - rice lines – nitrogen, in typic haplustalf. Ibagué, Colombia

Margarita M. Vallejo,<sup>1</sup> Carmen R. Bonilla C.,<sup>2</sup> Luis A. Castilla<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ingenio Manuelita, vía Palmira – Buga, km 7. asurnima@manuelita.com <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 237 Palmira, Valle del Cauca.  
Autor para correspondencia: crbonillac@unal.edu.co <sup>3</sup> Fedearroz, Ibagué.

REC.: 17-07-07 ACEPT.: 14-12-07

### RESUMEN

El estudio se llevó a cabo en la hacienda Cauchitos, municipio de Ibagué, departamento del Tolima (Norte 4° 23' 51" y Oeste 75° 9' 7", 979 msnm, 24.3°C, bosque seco tropical (bs-T), con el objetivo de evaluar las asociaciones entre bacterias fijadoras de nitrógeno con inóculo y sin él en diez líneas interespecíficas de arroz, con tres dosis de nitrógeno (0%, 50% y 100% de 250 kg/ha<sup>-1</sup>) y tres repeticiones por tratamiento. La inoculación se realizó con 1 cm<sup>3</sup> de unidades formadoras de colonias por 250 g de semilla de cada cultivar. Se aislaron 2.260 bacterias de los géneros *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp, se identificaron las especies *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* y del género *Azotobacter* las especies *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. paspali* y *A. beijerinckii*. Respecto al inóculo no se encontraron diferencias significativas al realizar su aplicación, se determinó que *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp fueron géneros típicos de la flora bacteriana en el cultivo del arroz y en condiciones de campo hubo efecto de los tratamientos en la flora bacteriana, y *Azotobacter* spp fue el predominante en cada uno de los tratamientos.

**Palabras claves:** *Oryza sativa*, *O. rufipogon*, *O. glaberrima*, *Azotobacter*, *Azospirillum*.

### ABSTRACT

The study was carried out at the Cauchitos farm, Ibague municipality department of Tolima, with bounds: North 4°23'51" and west 75°9'7", 979 ansm, the average temperature is 24,3°C, tropical dry forest (bs-t) in the Holdridge classification. The purpose of this study was to evaluate the association between the nitrogen fixation bacterias with and without inoculo in 10 interspecific rice lines with three nitrogen dosis (0, 50 and 100% de 250 kg/ ha<sup>-1</sup>) and three repetitions. The inoculation was realized with 10<sup>8</sup> former units of colonies per millimeter. 2.260 bacterias of the generums *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp., and identification the species: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum amazonense*, were identified and from the genus *Azotobacter* were identified the species: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. paspali* and *A. veijerinckii*. Weren't found none significative differences after the inoculation. *Azotobacter* spp and *Azospirillum* spp. were typical generums of the bacterian flora in the rice plantation and in field conditions were effect of the treatment effects in the bacterian . The *Azotobacter* spp was the predominant in generum in each one of the treatments.

**Key words:** *Oryza sativa*, *O. rufipogon*, *O. glaberrima* , *Azotobacter*, *Azospirillum*

### INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el consumo de fertilizantes nitrogenados aumentó de 8 a 17 kg ha<sup>-1</sup> en suelos agrícolas en un periodo de 15 años (1973-1988) y se predice que los requerimientos de fertilizantes nitrogenados aumentarán en el futuro; sin embargo, con la tecnología actual de producción de fertilizantes y los métodos de aplicación empleados que resultan poco eficientes, así

como el costo y la contaminación ecológica que producen, su uso se hace más prohibitivo.

En las dos últimas décadas se ha relevado la existencia de asociaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno, con gramíneas forrajeras tropicales y cereales. Dentro de las características más importantes está la interacción entre la disimilación y asimilación de nitratos y la fijación de nitrógenos cuya manipulación

debe representar la clave para complementar la fijación con abonos minerales

El nitrógeno es el nutrimento que más influye en los rendimientos; se le considera un factor limitante en la producción del cultivo del arroz (León *et al.*, 1981). En las plantaciones de arroz la demanda de fertilizantes nitrogenados está ubicada entre los rubros más altos de la producción.

El arroz constituye el alimento primordial para un tercio de la población mundial. Tomando en consideración el desarrollo demográfico actual, se estima que su producción mundial deberá aumentar en un 40% para el año 2020. El cultivo de arroz utiliza cantidades sustanciales de nitrógeno, de la cantidad total de nitrógeno molecular fijada cada año el 69.5% corresponde a la fijación biológica y el 15% es fijado por el hombre para convertirlo en abonos. Para fijar los 40 millones de toneladas de fertilizantes que cada año son arrojados a los campos se requiere un empleo masivo de combustibles fósiles. El encarecimiento de estos combustibles, así como la contaminación ambiental que produce la aplicación masiva de los fertilizantes nitrogenados hace su uso cada día más restringido

El nitrógeno es el nutrimento que más limita la producción del cultivo de arroz (León *et al.*, 1981), por tal razón la demanda de fertilizantes nitrogenados corresponde al 20% de los costos en la producción. La tecnología actual de producción de fertilizantes y los métodos de aplicación se califican como poco eficientes, además, si se considera el costo y la contaminación que producen, el uso se hace más restringido.

Al ser relevante el desconocimiento de la fijación biológica de nitrógeno, el estudio es un reto biotecnológico como sustituto parcial de fertilizantes nitrogenados. Los objetivos de la investigación fueron evaluar las asociaciones entre bacterias fijadoras de nitrógeno con inóculo y sin él en líneas interespecíficas de arroz con tres dosis de nitrógeno, en un *Typic haplustalf*, y como objetivos específicos se planteó cuantificar las poblaciones bacterianas *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp, y aislar y purificar las poblaciones reportadas en la cuantificación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se realizó en la hacienda Cauchitos, municipio de Ibagué, departamento del Tolima (4° 23' 51" Norte; 75° 9' 7" Oeste, 979 msnm, con una humedad relativa de 64 – 86.1%, precipitación de 1.450 mm año, correspondiente a bosque seco tropical - bs-t). El suelo se caracteriza físicamente por presentar un horizonte ap de 18 cm con textura franco arenosa,

estructuras migajosas y estabilidad de agregados baja; y un segundo horizonte Bt argílico con concentración alta de arcilla, con profundidad entre 18 cm y 54 cm, estructura prismática y estabilidad de agregados alta; el drenaje es lento y la retención de humedad alta; químicamente son neutros a alcalinos, con concentraciones altas de calcio, carbonatos, potasio, magnesio y elementos menores; el contenido de azufre y materia orgánica es bajo (Castilla, 2005).

Se sembraron en surco (10 kg ha<sup>-1</sup>) 10 cultivares de arroz representantes de buena parte de la base genética de *Oryza*, se tomaron las muestras en los siguientes tiempos: muestra inicial de suelo testigo (sin cultivo, sin inóculo y sin fertilización nitrogenada), suelo después de los 60 días de la siembra de arroz (periodo de emergencia) y en periodo de cosecha; cada material se evaluó con inoculación y sin ella, con un biofertilizante que tuvo una concentración de 1 x 10<sup>10</sup> UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias Bacterianas) de la cepa IBUN-B01 de *Azotobacter chroococcum* (registro interno del cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá: IBUN No.142111) y de la cepa IBUN-B02 de *Azospirillum amazonense* (registro interno IBUN No. 121111), las cuales fueron aisladas en el laboratorio de microbiología del suelo del Departamento de Biología de la Universidad Nacional - Bogotá. La inoculación se realizó con una concentración de 1 cm<sup>3</sup> por 250 g de semilla de cada cultivar y la siembra fue inmediata.

Se estudiaron tres dosis de nitrógeno: 0%, 50% y 100% de 250 kg de nitrógeno/ha, la fuente utilizada fue urea granular con 46% de N. Los demás nutrimentos se aplicaron de acuerdo con el análisis del suelo con 23 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> como fosfato diamónico (18-46-0) y 60 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O en forma de cloruro de potasio (60% de K<sub>2</sub>O). Al suelo en cada parcela se le adicionó agua hasta saturarlo, manteniéndolo en ese estado hasta cosecha. Se realizó análisis de varianza (ANAVA) para comparar las medias de los tratamientos de acuerdo con el diseño de parcelas subdivididas donde las dosis de nitrógeno corresponden a la parcela principal, el inóculo (sin él y con él) a la subparcela, y los genotipos (10) a las subparcelas, con tres repeticiones. Donde hubo significancia se realizó una prueba de comparación de medias por DMRT (Duncan Multiple Range Test) y se complementó el análisis mediante la técnica de estadística multivariada de la correlación parcial de Pearson. La disposición de los tratamientos se presenta en la Tabla 1.

Los análisis microbiológicos incluyeron la cuantificación de poblaciones bacterianas, aislamiento, pruebas bioquímicas. Para el recuento de las poblaciones

**Tabla 1. Disposición de los tratamientos en campo**

Cultivares	0% de N		50% de N		100% de N	
	con inóc.	sin inóc.	con inóc.	sin inóc.	con inóc.	sin inóc.
<i>Oryza rufipogon</i>	121	131	151	141	161	171
CT 16049-7-3-1	122	132	152	142	162	172
CT 13943-14-3-M-M	123	133	153	143	163	173
CT-1452-20-M-3-4	124	134	154	144	164	174
FEDEARROZ 50	125	135	155	145	165	175
BG 90-2	126	136	156	146	166	176
CIRAD	127	137	157	157	167	177
CT-13941-11-M-16	128	138	158	148	168	178
CT-16049-7-3-1-2	129	139	159	149	169	179
<i>Oryza glaberrima</i>	130	140	160	150	170	180

• Fuente: Vallejo, 2006.

bacterianas se utilizaron los medios de cultivo Ashby y LG y se realizó el método de conteo de diluciones Winogradski, las estimaciones se hicieron a partir de las 24h de incubación. Para identificar los géneros se realizaron pruebas bioquímicas y de tinción.

Se utilizó Ashby para aislar *Azotobacter* spp y LG para *Azospirillum* spp. aplicando el método de siembra de gránulos de suelo. Se escogieron 50 cajas de petri

con bacterias de apariencia morfológica diferente, con el fin de realizarles las pruebas bioquímicas, se determinó la producción de catalasa, H<sub>2</sub>S, licuación de gelatina, hidrólisis de almidón. Se analizaron tres cajas por muestra, colocando 10 g de suelo en cada una. Cada bacteria se sembró e incubó en los medios apropiados para cada actividad, al cabo de siete días se observaron los cambios. Se adoptó la metodología descrita por Llanos y Sánchez de P. (1982) y se clasificó de acuerdo con las características reportadas en el manual de Bergey y Holt, 1974, y se complementó la morfología con tinciones de Gram. Las pruebas bioquímicas se realizaron a tres muestras de bacterias por cada grupo de color; se seleccionaron al azar las cajas petri con la línea interespecifica aislada.

Los datos se analizaron empleando el programa S.A.S. (Statistical Analysis System), además del análisis de varianza con arreglo en bloques y prueba de Duncans.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la fertilización nitrogenada sobre las poblaciones de *Azotobacter* y *Azospirillum*

En el suelo testigo la población microbiana del género *Azotobacter* fue baja (Tabla 2), pues el rango promedio de UFCB osciló entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>9</sup>. *Azospirillum*

**Tabla 2. Efecto de la no aplicación de nitrógeno sobre la población de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp en suelos sembrados con diez cultivares de arroz. \***

Cultivares	<i>Azospirillum</i> spp sin nitrógeno UFCB/gss	<i>Azotobacter</i> spp sin nitrógeno UFCB/gss	<i>Azospirillum</i> spp 50%N UFCB/gss	<i>Azotobacter</i> spp 50%N UFCB/gss	<i>Azospirillum</i> spp 100%N UFCB/gss	<i>Azotobacter</i> spp 100%N UFCB/gss
BG 90-2	1.60*10 <sup>7a</sup>	1.60*10 <sup>7a</sup>	1.55*10 <sup>7a</sup>	1.58*10 <sup>7a</sup>	1.54*10 <sup>7a</sup>	1.58*10 <sup>7a</sup>
Cirad	<b>1.70*10<sup>8b</sup></b>	<b>1.70*10<sup>8b</sup></b>	1.68*10 <sup>7a</sup>	1.73*10 <sup>7a</sup>	<b>1.70*10<sup>8b</sup></b>	<b>1.72*10<sup>8b</sup></b>
CT-13941-11-M16	1.57*10 <sup>7a</sup>	1.68*10 <sup>7a</sup>	1.39*10 <sup>7a</sup>	1.54*10 <sup>7a</sup>	1.3*10 <sup>7b</sup>	1.52*10 <sup>7a</sup>
CT-13941-11-M34	1.47*10 <sup>7a</sup>	1.66*10 <sup>7a</sup>	1.45*10 <sup>7a</sup>	1.52*10 <sup>7a</sup>	1.45*10 <sup>7b</sup>	1.41*10 <sup>7a</sup>
CT-1452-10-M-34	1.61*10 <sup>7a</sup>	1.69*10 <sup>7a</sup>	1.56*10 <sup>7a</sup>	1.63*10 <sup>7a</sup>	1.59*10 <sup>7b</sup>	1.47*10 <sup>7a</sup>
CT-16049-731	1.55*10 <sup>7a</sup>	1.59*10 <sup>7a</sup>	1.40*10 <sup>7a</sup>	1.48*10 <sup>7a</sup>	1.37*10 <sup>7b</sup>	1.42*10 <sup>7a</sup>
CT-16049-731-2	1.58*10 <sup>7a</sup>	1.45*10 <sup>7a</sup>	1.70*10 <sup>7a</sup>	1.72*10 <sup>7a</sup>	1.41*10 <sup>7b</sup>	1.20*10 <sup>7a</sup>
FEDEARROZ 50	1.57*10 <sup>7a</sup>	1.60*10 <sup>7a</sup>	1.64*10 <sup>7a</sup>	1.57*10 <sup>7a</sup>	1.62*10 <sup>7b</sup>	1.53*10 <sup>7a</sup>
<i>Oryza glaberrima</i>	<b>1.70*10<sup>8b</sup></b>	<b>1.70*10<sup>8b</sup></b>	<b>1.62*10<sup>8b</sup></b>	<b>1.61*10<sup>8b</sup></b>	<b>1.68*10<sup>8b</sup></b>	<b>1.73*10<sup>8b</sup></b>
<i>Oryza rufipogon</i>	1.63*10 <sup>7a</sup>	1.68*10 <sup>8b</sup>	1.69*10 <sup>7a</sup>	1.72*10 <sup>7a</sup>	1.56*10 <sup>8b</sup>	1.50*10 <sup>8b</sup>

registró un número significativamente mayor de UFCB ( $1.11^7$ ). En los suelos sembrados con Cirad y *O. glaberrima* se presentaron diferencias significativas entre las UFCB de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp, con relación a los demás cultivares.

El número de UFCB de *Azotobacter* aumentó cuando se fertilizó con 50% y 100% de N, respecto al suelo sin fertilización; *Azospirillum* spp aumentó al fertilizar con 50% y disminuyó al aplicar 100% de N. Al fertilizar con 50%N las UFC de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp en suelos sembrados con el cultivar *O. glaberrima* presentaron diferencias significativas con las demás líneas interespecíficas y cultivares. El género *Azotobacter* spp predominó sobre *Azospirillum* spp (Tabla 3). Al aplicar 100%N (Tabla 4), las UFC/gss fueron menores que en las aplicaciones de 50%N, al igual que cuando no se efectuó la fertilización; Cirad y *O. glaberrima* reportaron diferencias significativas en el número de UFCB frente a los restantes cultivares, probablemente por la disminución de la competencia de las bacterias por nitrógeno al haber mayor disponibilidad del nutriente en el suelo. En este caso, las bacterias no dependen de una planta hospedera para establecer la simbiosis sino que pueden adquirir el nitrógeno directamente del suelo y el carbono de las reservas de materia orgánica del suelo (Burbano, 1987).

En general, sin fertilización nitrogenada la actividad bacteriana se encontró estable. Al aplicar la primera dosis de nitrógeno (50%N), la actividad se incrementó, fue mayor la competencia y otras bacterias

**Tabla 3. Efecto de la aplicación de 50% N sobre la población de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp en suelos sembrados con diferentes cultivares de arroz.**

Cultivares	UFC/gss <i>Azospirillum</i> spp	UFC/gss <i>Azotobacter</i> spp
BG 90 -2	$1.55 \cdot 10^{7a}$	$1.58 \cdot 10^{7a}$
cirad	$1.68 \cdot 10^{7a}$	$1.73 \cdot 10^{7a}$
CT - 13941 - 11 - 16	$1.39 \cdot 10^{7a}$	$1.54 \cdot 10^{7a}$
CT - 13941 - 11 - 16	$1.45 \cdot 10^{7a}$	$1.52 \cdot 10^{7a}$
CT - 1452 - 10-M-4	$1.56 \cdot 10^{7a}$	$1.63 \cdot 10^{7a}$
CT-16049-731	$1.40 \cdot 10^{7a}$	$1.48 \cdot 10^{7a}$
CT-16049-731-2	$1.70 \cdot 10^{7a}$	$1.72 \cdot 10^{7a}$
FEDEARROZ 50	$1.64 \cdot 10^{7a}$	$1.57 \cdot 10^{7a}$
<i>Oryza glaberrima</i>	<b><math>1.62 \cdot 10^{8b}</math></b>	<b><math>1.61 \cdot 10^{8b}</math></b>
<i>Oryza rufipogon I</i>	$1.69 \cdot 10^{7a}$	$1.72 \cdot 10^{7a}$

aa No existen estadísticamente diferencias significativas.

ab Sí existen estadísticamente diferencias significativas.

**Tabla 4. Efecto de la aplicación de 100%N sobre la población de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp en suelos sembrados con diferentes cultivares de arroz.**

Cultivares	UFCB/gss <i>Azospirillum</i> spp	UFCB/g ss <i>Azotobacter</i> spp
BG 90-2	$1.54 \cdot 10^{7a}$	$1.58 \cdot 10^{7a}$
cirad	<b><math>1.70 \cdot 10^{8b}</math></b>	<b><math>1.72 \cdot 10^{8b}</math></b>
CT-13941 - 11 - M16	$1.3 \cdot 10^{7a}$	$1.52 \cdot 10^{7a}$
CT-13941 - 11 - M16	$1.45 \cdot 10^{7a}$	$1.41 \cdot 10^{7a}$
CT-1452-10-M-34	$1.59 \cdot 10^{7a}$	$1.47 \cdot 10^{7a}$
CT-16049-731	$1.37 \cdot 10^{7a}$	$1.42 \cdot 10^{7a}$
CT - 16049 - 731 - 2	$1.41 \cdot 10^{7a}$	$1.20 \cdot 10^{7a}$
FEDEARROZ 50	$1.62 \cdot 10^{7a}$	$1.53 \cdot 10^{7a}$
<i>Oryza glaberrima</i>	<b><math>1.68 \cdot 10^{8b}</math></b>	<b><math>1.73 \cdot 10^{8b}</math></b>
<i>Oryza rufipogon I</i>	$1.56 \cdot 10^{8b}$	$1.50 \cdot 10^{8b}$

aa No existen estadísticamente diferencias significativas.

ab Sí existen estadísticamente diferencias significativas.

se desplazaron en búsqueda del nutriente, contrario a lo que sucedió cuando existe suficiente nutriente, donde la actividad microbiana vuelve a disminuir. La variación de la presencia de las bacterias nitrificantes radica en la diferencia en sensibilidad y respuesta a las prácticas de manejo conservacionista como la labranza mínima, altos contenidos de materia orgánica, entre otros (Haydes,1986, citado por Rivera, 2003). La población bacteriana tiende a dominar especialmente en capas superficiales; si se incorporan residuos al suelo se crean condiciones favorables para las bacterias. La mayor parte del reservorio de nitrógeno mineral que no está inmovilizado en los microorganismos del suelo las plantas lo absorben y asimilan durante la etapa de crecimiento, el tiempo de persistencia del nitrógeno en el suelo es muy variable dado que la longevidad de las moléculas que contienen nitrógeno en el suelo está en función de la solubilidad, del grado de ligamiento de los coloides del suelo y de la facilidad con que las uniones sean rotas por los microorganismos (Haydes,1986, citado por Rivera, 2003).

El mayor o menor número de unidades formadoras de colonias bacterianas fijadoras de nitrógeno implica un incremento en la disponibilidad del nutriente en el suelo, por lo tanto esta propiedad se va a reflejar en otros parámetros como el crecimiento y la producción en el caso del cultivo de arroz. Uno de los mayores rubros en el cultivo de arroz es la fertilización nitrogenada. Primavesi (1982) señala que el efecto de la raíz sobre los microorganismos es tanto mayor cuanto más deficiencias de nitrógeno tiene el suelo, debido a la presen-

cia de exudados radicales, que sirven como fuente de alimento para las bacterias; así mismo sugiere que en suelos ricos en materia orgánica el efecto desaparece, mientras que en suelos con deficiencias nutricionales es más fuerte.

### Efecto de la inoculación en los tratamientos

En cuanto a la inoculación no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, es decir, inocular no ocasiona ningún efecto en el número de UFCB, pero cuando se inoculó y se fertilizó la combinación de los tratamientos incrementó el número de UFCB/gss. El número de UFCB/gss de *Azospirillum* aumentó en *O. glaberrima* y Cirad. Martínez (2001) afirma que la respuesta a la inoculación en combinación o por separado con *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp depende del genotipo utilizado.

Castilla (2005) al realizar la evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza* spp) a la inoculación con las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en el mismo suelo, concluye que la inoculación con *A. chroococcum* y *A. amazonense* y 50% de la fertilización nitrogenada produjeron plantas de arroz más vigorosas, con mayor biomasa aérea y radical; especialmente en las líneas interespecíficas Cirad y Cirad CT13941 logró la mayor altura a los 60 días de siembra; sin embargo, a la cosecha este efecto no apareció.

Durante los tres periodos de muestreo: muestra inicial de suelo testigo, muestra con suelo después de los 60 días de la siembra de arroz y periodo de cosecha, se detectó la presencia de los dos géneros

bacterianos; sesenta días después de la siembra fue mayor el aporte del tejido muerto de la siembra anterior y de los exudados del sistema radical, debido a la mayor actividad fisiológica por la primera floración. Como el tipo de nutrición de los dos géneros bacterianos requieren materia orgánica preformada como fuente de energía y carbono (Burbano, 1989), estos dos aspectos y las propiedades físicas y químicas de los suelos podrían explicar la abundancia de los dos géneros. (Figura 1)

Los datos obtenidos a partir del muestreo realizado 60 días después de la siembra no presentaron variaciones significativas entre tratamientos; los cultivares que mejor respondieron a los tratamientos respecto a las UFCB fueron Fedearroz 50, *O. glaberrima* y *O. rufipogon*, con valores que oscilaron entre  $1.42 \times 10^8$  y  $1.97 \times 10^8$  respectivamente. La población de *Azotobacter* spp fue similar durante los dos periodos de muestreo, en todos los tratamientos; *Azospirillum* spp reportó variaciones poblacionales. Los cultivares *O. rufipogon*, *O. glaberrima* y Cirad continuaron manteniendo los mejores estándares poblacionales de los dos géneros. Las mayores poblaciones de UFCB se presentaron en la aplicación 50%N. Martínez (2001) dice que existe positiva y marcada influencia del nitrógeno sobre los rendimientos de arroz y que este efecto es mayor cuando se fracciona en dos aplicaciones; la mitad a los 45 días después de la siembra, igualmente en la siembra, el mejor rendimiento se obtuvo con niveles de 120, 80 y 40 kg/ha de N,  $P_2O_5$  y  $K_2O$  respectivamente incorporado al suelo, obteniendo una producción de 7.832 kg/ha, contra el testigo 3.558 kg /ha.

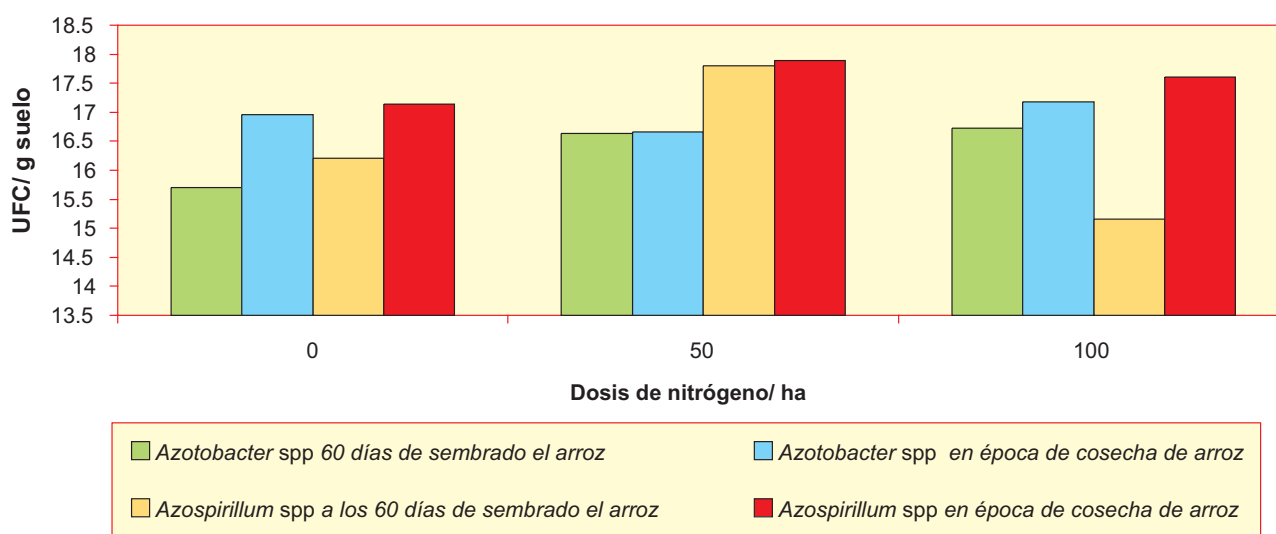


Figura 1. Efecto de las dosis de nitrógeno sobre las UFCB/gss de los géneros *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp en las dos épocas de muestreo.



En la época de cosecha *Azotobacter* registró entre  $1.34 \times 10^7$  UFCB/gss y  $1.44 \times 10^8$  UFCB/gss. *O. glaberrima* fue el cultivar que mejor respondió a los tratamientos. Esto se debe probablemente a las características genotípicas de la línea y al efecto positivo de los tratamientos sobre ella. *Azospirillum* spp reportó valores desde  $1.33 \times 10^7$  UFCB/gss hasta  $1.79 \times 10^8$  UFCB/gss. El cultivar Cirad respondió mejor a los tratamientos.

### Género bacteriano predominante

*Azotobacter* predominó sobre *Azospirillum*; en *Azotobacter* spp no se observó la presencia de quistes, los cuales se forman cuando las condiciones de vida se tornan desfavorables para el desarrollo continuo de las bacterias (Correa, 2001). Las especies del género *Azospirillum* son menos competitivas en la ocupación de sustratos ya colonizados por *Azotobacter* spp (Dobereiner, 1975).

En general en los suelos arroceros de la meseta de Ibagué la mayor proporción de porosidad está constituida por microporos en la rizosfera, la constante liberación de carbono y las bajas tensiones de oxígeno conforman un ambiente favorable para los fijadores de nitrógeno (Díaz, 2002). Burbano (1989) dice que los exudados producidos por las gramíneas estimulan el crecimiento de las bacterias, especialmente las fijadoras de nitrógeno. Los sistemas de asociaciones más comunes son *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp.

### Aislamientos

Se realizaron 2.260 aislamientos de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp, se registraron 55 cepas y 20 se identificaron hasta especie. El 78% presentó forma de coco y 22% de bacilo. Se identificaron las formas características de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp, tales como células con forma de bastón y redonda unas veces alargadas, cortas y agrupadas en estreptobacilos. De 39 cepas, 20 fueron Gram negativas y 18 Gram positivas, incluyendo los bacilos. En la rizosfera predominan las Gram (-) porque presentan elevadas tasas de crecimiento, en respuesta a la adición de aminoácidos y azúcares solubles (Siquiera y Franco, 1988; Cardoso, 1992).

De 60 muestras bacterianas, repartidas en 15 de acuerdo con el grupo de color, y realizando tres repeticiones por muestra, 90% fueron catalasa positiva y 60% degradaban almidones. Respecto a la producción de ácido sulfhídrico a partir de peptona 76% reaccionaron positivamente y 30% produjeron ureas 93% fueron aeróbicas, lo cual está muy ligado a organismos que tiene habilidad para producir catalasa (Figura 2).

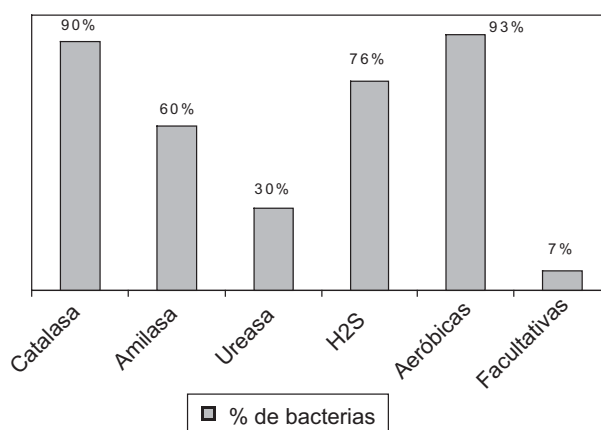


Figura 2. Interpretación de las pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas.

La respiración de la población aeróbica se incrementa con el contenido de agua del suelo y logra el máximo cuando el porcentaje del espacio poroso lleno de agua alcanza 60%, la actividad de los microorganismos aeróbicos declina por encima de este 60% toda vez que el agua adicional aparentemente limita la difusión del oxígeno a través del suelo; el estado de agua en los suelos superficiales sometidos a no labranza resulta mejor para la actividad microbiana que el de suelos sometidos a la labranza convencional (Burbano, 1989). Respecto a la flora bacteriana, predominan cocos, gram (-), aeróbicos con alta actividad de catalasa, amilasa y proteasa y muy baja actividad de ureasa, lo cual lleva a pensar que en el suelo estudiado puedan existir disturbios en el ciclo del nitrógeno, que pueden conducir a incrementar los gastos en este elemento o a ineficiencia en el suministro a la planta; especialmente a partir de fertilización química (Díaz, 2002).

### Cuantificación bacteriana total

En este trabajo la población total fluctuó entre  $1.33 \times 10^7$  y  $1.87 \times 10^8$  UFCB/gss, registrándose los mayores valores en las líneas *O. rufipogon*, *O. glaberrima* y CIRAD. La comunidad microbiana se estimó en aproximadamente  $10^6$  a  $10^9$  UFC/gss, variando de acuerdo con el método de conteo o el tipo de manejo del suelo. Las bacterias pueden llegar a presentar entre 25-30% de la biomasa microbiana total (Díaz, 2002).

Las colonias de *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum* usualmente aparecieron en forma de un papelillo sobre la superficie entre los 3 y 5 días, después de 2 semanas fueron pequeñas de aspecto blanco y seco; al secarse las colonias se tornaron rosa. *A. brasilense* son bacterias motiles y se desplazan en espiral. La forma de *A. lipoferum* inicialmente fue indistinguible y se tor-

naron de un color azul por estar en un medio alcalino, el cual ocasiona cambios y hace que la bacteria adopte una forma pleomórfica. Las colonias de *A. amazonense* se formaron después de cinco días en un medio de N<sub>2</sub>, las colonias fueron blancas y de 5 mm de largo. Las colonias de *A. chroococcum* aparecieron después de 24 horas de incubación a 30°C, inicialmente fueron blancas, pero después de 3 a 5 días se tornaban café oscuro. Las colonias de *A. vinelandii* fueron similares pero no se tornaron oscuras; las de *A. paspali* presentaron motilidad por flagelos, las cuales pueden alcanzar 10-15 μm de longitud (Dobereiner, 1975).

Las colonias de *A. vinelandii* inicialmente fueron blancas y pequeñas, para luego alargarse y tornarse de color café; según Dobereiner (1975), las colonias inicialmente son blancas por la fijación de N<sub>2</sub> y pueblan rápidamente, posiblemente por los polisacáridos capsulares de la bacteria; estas colonias se extienden para proteger el O<sub>2</sub>. El aislamiento de *A. paspali* se incubó fácilmente a 35°C por siete días. Las colonias que fijaron nitrógeno fueron de color beige luminoso, las que no lo hicieron fueron de color café. Después de 4 a 10 días de incubación a 30°C, *A. beijerinckii* formó pequeñas colonias blancas que se extendieron rápida y fijamente.

Las colonias de *Azotobacter chroococcum*, en el medio de cultivo Ashby manitol, presentaron a los tres días las siguientes características: pardo amarillentas, traslúcidas, circulares, con bordes irregulares y consistencia elevada; a los tres días se tornaron de color café a negro, brillantes, circulares, con bordes irregulares, consistencia viscosa y sin elevación. La presencia de *Azotobacter* spp se verificó por el crecimiento de la bacteria en el medio específico y se observaron crecimientos con mucosidad alrededor de los gránulos (Novo, 1988).

Las colonias de *A. vinelandii* se diferenciaron de *A. chroococcum* porque producen un pigmento verde fluorescente y células pequeñas.

### CONCLUSIONES

Los mayores valores de unidades formadoras de colonias de *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp se presentaron en suelos sembrados con las líneas *O. rufipogon*, *O. glaberrima* y Cirad.

*Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp son géneros presentes de la flora bacteriana en suelos cultivados con arroz. *Azotobacter* spp predominó en todos los tratamientos.

Se identificaron las siguientes especies: *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* y del género *Azotobacter* se identificaron las especies *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. paspali*.

### AGRADECIMIENTOS

El artículo se derivó del Trabajo de Maestría de la primera autora, financiado por la Federación Nacional de Arroceros, Fedearroz; dentro del marco del Macroproyecto Evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza Spp*) a la inoculación con las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en un *Typic haplustalf* de la meseta de Ibagué, Colombia.

Extendidos agradecimientos para el equipo del laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira (Valle del Cauca) y el laboratorio de microbiología del suelo de Corpoica Tibaitatá (Cundinamarca). Colombia.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Bergey y Holt., 1974. Manual Bergey's of determinative bacteriology. 8<sup>th</sup> ed: I Baltimore, 967p.
2. Burbano, H. 1989. El suelo: una visión sobre sus componentes bioorgánicos. Pasto: Universidad de Nariño, 447p.
3. Cardoso, F. 1999. Rizosfera. In: Sociedad Brasileira de La Ciencia del Suelo(ed). Microbiología do solo. Campinas, p 499
4. Castilla, L. A. 2005. Evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza spp*) a la inoculación con las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en un *Typic haplustalf* de la meseta de Ibagué. Colombia. Tesis (Ph.D. suelos y aguas). Universidad Nacional de Colombia. Palmira, 156p.
5. Correa, L. 2001. Evaluación preliminar de la actividad microbiana en suelos con alta saturación de magnesio y residualidad de plaguicidas en el valle del río Cauca. Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira. Tesis de grado, 54 p.
6. Díaz, A. C. 2002. Estimación de la flora fungosa y bacteriana en suelo del norte del valle cultivados con maracuyá *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* con diferente manejo agronómico, edad y estado sanitario. Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira. Tesis de grado, 47 p.
7. Dobereiner, J. 1975. Nonsymbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. *Plant Soil*. Special volumen p. 457-470.
8. Martínez, C. 2001. Evaluaciones al cultivo del arroz. Ciat, 20 p.
9. Novo, R. 1988. Vida Microbiana en el Suelo. Cuba: Editorial Puebla y Educación. 523 p.
10. León, et al., 1981. Factores que afectan la respuesta a la fertilización nitrogenada del arroz. Ciat. 25p.
11. Llanos, C.; Sánchez M. 1982. Experimentos con microorganismos. Palmira: Universidad Nacional de Colombia. 35 p.
12. Primavesi, A. 1982. Manejo ecológico del suelo. La agricultura en regiones tropicales. Buenos Aires: El Ateneo. 499 p.
13. Rivera, M. 2003. Caracterización y evaluación de la respuesta al nitrógeno en sistemas de monocultivo de rotación, utilizando los modelos CERES-RICE y CERES – MAIZE en oxisoles de los Llanos Orientales, Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira.
14. Siqueira, J.; Franco, A. 1988. Biotecnología do solo: Fundamentos e perspectivas. Sao Paulo: Gráfica Nagy. 235 p.