

# EFFECTO DE LA FERTILIDAD DEL SUELO SOBRE LA MICROBIOTA Y LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DEL MAÍZ (*Zea mays* L.) CON *Azotobacter* spp.

Isbelia Reyes<sup>1</sup> y Alexis Valery<sup>1</sup>

## RESUMEN

El estudio de las poblaciones microbianas permite evaluar la fertilidad y las condiciones ecológicas de los suelos. En este trabajo se cuantificaron las densidades poblacionales bacterianas y fúngicas cultivables totales y disolventes de fosfatos de calcio en la rizósfera de plantas silvestres y cultivadas en cinco diferentes suelos del estado Táchira; y se evaluó en umbráculo dos cepas en la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.), variando la fertilidad con la adición de fertilizantes químicos. Se utilizó el método de diluciones y siembra en placa para las determinaciones microbianas de los suelos. Se cuantificó el peso seco de las plantas de maíz en los ensayos en donde se utilizaron las cepas de *Azotobacter* MF1b y MF5, solas y en cultivo mixto, con los tratamientos químicos de K, NK, PK, RK, NPK y NRK (R es roca Fosfórica). Se encontró que las densidades poblacionales microbianas totales y disolventes de fosfatos variaron con las condiciones físicas y químicas del suelo y con el tipo de la especie vegetal. En función de las densidades poblacionales microbianas, el buen estado nutricional de un suelo se reflejó en una baja relación rizósfera/suelo (R/S) en contraposición con uno de alto deterioro físico-químico causado por explotación minera. En el ensayo de umbráculo con maíz la cepa *Azotobacter* MF1b incrementó significativamente el peso seco en los tratamientos químicos NK y RK, lo que la presenta como una cepa con potencial de uso en la agricultura sostenible.

**Palabras clave adicionales:** Disolución de fosfatos, poblaciones microbianas, rizósfera

## ABSTRACT

### **Effect of soil fertility on microbiota and corn (*Zea mays* L.) growth promotion with *Azotobacter* spp.**

The study of microbial populations allows the evaluation of a soil fertility and its ecological condition. In this paper, the total and calcium phosphate solubilizing culturable bacteria and fungi population densities were evaluated in the rhizosphere of wild and crop plants from five different soils of Táchira State. By changing the soil fertility with several chemical fertilizer treatments two *Azotobacter* strains were evaluated for the growth promotion of corn (*Zea mays* L.). The dilution plate and culture method were used for soil microbial determinations. The dry weight of corn plants was quantified in the assays using the *Azotobacter* strains MF1b and MF5, alone and in mixed culture with the chemical treatments of K, NK, PK, RK, NPK and NRK (R is phosphoric rock). It was found that the total microbial and phosphate solubilizing population densities showed changes according to the physical and chemicals conditions of the soil and to the type of each vegetal species. After the microbial densities of the soils, a low ratio rhizosphere/soil (R/S) was showed by one with good nutritional conditions in contraposition with other with high physical and chemical deterioration due to mine exploitation. The *Azotobacter* strain MF1b increased significantly the dry weight of corn in a greenhouse assay with the chemical treatments NK and RK. It is concluded that this strain has a potential use in the sustainable agriculture.

**Additional key words:** Microbial populations, phosphate solubilization, rhizosphere

## INTRODUCCIÓN

El suelo es considerado un espacio heterogéneo definido por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que bajo condiciones naturales tiende a desarrollar un equilibrio dinámico entre sus diferentes atributos, lo que genera las condiciones

adecuadas para una diversidad de organismos transformadores y descomponedores de sustratos. En general, se considera que la microbiota del suelo, conformada principalmente por bacterias y hongos, juega un papel importante en la fertilidad, reciclaje de nutrientes, evolución, estructura y conservación del mismo.

---

Recibido: Febrero 2, 2007

Aceptado: Septiembre 9, 2007

<sup>1</sup> Laboratorio de Biofertilizantes, Decanato de Investigación, Universidad Nacional Experimental del Táchira. Apdo. 5001. Paramillo, estado Táchira. Venezuela. e-mail: isreyes@unet.edu.ve; avalery@unet.edu.ve

La densidad y diversidad de microorganismos son susceptibles a variar dependiendo de la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta, de las características físico químicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales (Marschner et al., 2004; Adeboye et al., 2006). Además, muchas de las relaciones que establecen los microorganismos del suelo pudieran beneficiar a la planta cuando ocurren en la zona próxima a sus raíces (rizósfera) que se caracteriza por poseer una gran cantidad de compuestos que son exudados por la planta (Kloepper, 1994). Se estima que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44% del carbono asimilado y otra serie de compuestos, los que contribuyen generalmente a un incremento de las densidades poblacionales de los microorganismos (Primavesi, 1984). Se ha encontrado que las densidades bacterianas y fúngicas presentes en esta zona de directo intercambio con la planta pueden llegar a ser entre 10 y 50 veces más grandes que en el suelo no rizosférico (Reyes et al., 2006). La presencia de microorganismos benéficos alrededor de la raíz establece y acelera procesos bioquímicos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que está asociado con un incremento de elementos químicos disponibles y la producción de sustancias de crecimiento o de control de patógenos. De allí que la diversidad y densidad de microorganismos sean indicadores de interés en el estudio de la calidad y sostenibilidad de los ambientes terrestres.

Las bacterias diazotróficas han sido consideradas de importancia agrícola por producir fitohormonas como las auxinas, citocininas y giberelinas, sustancias que favorecen el desarrollo de la planta. Se ha observado efecto sobre el crecimiento de la raíz y resistencia al estrés osmótico por aumento de clorofila, K, Ca, azúcares solubles y proteínas, e incremento de P en el tejido por su acción en la disolución de fosfatos y minerales del suelo (Vessey, 2003; Kennedy et al., 2004). Asimismo, se ha reportado incremento de la germinación de las semillas de trigo (Nikitina et al., 2004), mayor vigor vegetativo y mayor altura en plantas de arroz (Biswas et al., 2000) e incremento del contenido de nutrimentos en plantas de trigo y algodón (Narula et al., 2005). Chabot et al. (1998) encontraron que el incremento en materia seca y la

absorción de nutrientes en el maíz inoculado con cepas del género *Rhizobium* podrían deberse al efecto de la colonización, la disolución de fosfatos y la producción de hormonas de crecimiento de este microorganismo.

En general, los suelos venezolanos de interés agrícola son conocidos por presentar deficiencias de nitrógeno y fósforo (Casanova, 1996). Diferentes especies microbianas han sido relacionadas con la movilización de estos nutrientes en el suelo, a través de la fijación biológica del N y/o la disolución de los fosfatos en la rizósfera de las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999; Narula et al., 2005; Reyes et al., 2006). El objetivo de este trabajo fue estudiar las densidades bacterianas y fúngicas cultivables totales y disolventes de fosfatos de calcio en la rizósfera de plantas silvestres y cultivadas del estado Táchira, así como evaluar el rol de dos aislamientos bacterianos identificados como bacterias del género *Azotobacter* en la promoción del crecimiento del cultivo de maíz bajo diferentes condiciones de fertilidad del suelo en umbráculo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localidades de muestreo

Se recolectaron muestras de plantas con suelo en las siguientes cinco zonas geográficas del estado Táchira, a partir de plantas silvestres y cultivadas para obtener una amplia biodiversidad microbiana: (1) Mina abandonada de roca fosfórica de Monte Fresco, ubicada en la zona alta de San Pedro del Río, municipio Ayacucho; (2) Módulo de Producción y Validación de Tecnologías Sostenibles (MOPROVATS), de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), en Paramillo, municipio San Cristóbal; (3) Finca La Tuquerena, de la UNET, municipio Junín; (4) Finca Villa Belén, en Loma de Pío, municipio San Cristóbal; y (5) Al sur-este de la población de Queniquea, municipio Sucre. Las muestras fueron trasladadas en condiciones de baja actividad bioquímica (~ 4 °C) al Laboratorio de Biofertilizantes de la UNET, donde fueron procesadas el mismo día.

### Análisis físico-químico de los suelos

El análisis físico-químico de las muestras fue realizado por el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de la UNET, determinando la

textura (Bouyucos), fósforo disponible (Bray I), potasio, calcio y magnesio (extracción con acetato de amonio), materia orgánica (Wakley y Black), pH en agua (2:1) y conductividad eléctrica en agua (5:1).

#### **Muestreo de microorganismos cultivables totales y disolventes de hidroxiapatita**

Las raíces de las plantas se sacudieron suavemente eliminando el suelo en exceso, quedando presente sólo el suelo rizosférico y el del rizoplano (en contacto con la raíz). Un grupo de estas raíces se colocaron en el interior de una fiola con 20 mL de solución isotónica estéril de cloruro de sodio al 0,89 %. El suelo adherido a la rizósfera de cada una de las plantas, se desprendió mediante un lavado en agitación constante durante una hora.

De la suspensión obtenida con la solución isotónica, se realizaron diluciones seriadas de la muestra hasta  $10^{-5}$ , las cuales fueron utilizadas para la siembra en placas de Petri previamente preparadas y vaciadas con los siguientes medios sólidos: (1) Papa-dextrosa-agar (PDA), con  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de estreptomicina y  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cloranfenicol para la inhibición de bacterias y el conteo de hongos cultivables totales, utilizando las diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ; (2) Agar nutritivo para el conteo de bacterias cultivables totales en las diluciones de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ; y (3) Medio mínimo con hidroxiapatita (HA, Reyes et al., 1999) constituido por 0,4 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,78 g de  $\text{KNO}_3$ ; 0,1 g de  $\text{NaCl}$ ; 0,54 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mg de  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,56 mg de  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1,40 mg de  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,7 g de HA ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) como fuente de fósforo; 10 g de dextrosa; 20 g de agar por litro de agua y pH ajustado a 6,5, para la cuantificación de hongos y bacterias cultivables disolventes de fosfatos de calcio, utilizando las mismas diluciones que para el conteo de bacterias y hongos cultivables totales. La actividad disolvente de HA se observó mediante la aparición de halos de clarificación alrededor de las colonias (Reyes et al., 1999). Se realizaron tres repeticiones por cada dilución y para cada una de las muestras, expresando los resultados como  $\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  de suelo seco, realizando los cálculos correspondientes de acuerdo al contenido de humedad del suelo.

Siguiendo la misma metodología descrita se determinaron los hongos y bacterias cultivables

totales y disolventes de HA, a partir de un gramo de suelo no-rizosférico proveniente de los primeros 10 cm de profundidad en las localidades de Monte Fresco, La Tuquerena y Queniquea. Los valores de densidad de microorganismos de la rizósfera y de microorganismos del suelo, permitió calcular la relación rizósfera/suelo (R/S) para hongos y bacterias cultivables totales y disolventes de calcio.

#### **Fertilización biológica y química del maíz en condiciones de umbráculo**

Del suelo de las minas de Monte Fresco se seleccionaron dos cepas de *Azotobacter* spp. previamente caracterizadas como disolventes de HA, para su evaluación del efecto promotor del crecimiento en plantas de maíz. En este ensayo se utilizó suelo proveniente de la finca La Tuquerena, en condiciones naturales sin enmiendas ni destrucción de su estructura física, y la unidad experimental fue un microcosmos conformado por una bolsa negra de polipropileno con 2 kg de suelo seco. Los microcosmos se colocaron bajo condiciones de umbráculo utilizando semillas del maíz híbrido Himeca-95, previamente bacterizadas, con las cepas de *Azotobacter* MF1b, MF5 y una suspensión mixta de las mismas. Las semillas se desinfectaron con etanol al 70 % por 8 minutos y seguidamente con cloro al 5 % por 15 minutos, lavándose posteriormente cuatro veces consecutivas con agua estéril. Previamente, se preparó una suspensión bacteriana entre  $1\cdot 10^8$  a  $1\cdot 10^9$   $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada una de las cepas y para el consorcio, se mezclaron las suspensiones bacterianas en las cantidades adecuadas. Cada suspensión se agregó a una solución de alginato de sodio al 2 % y por último las semillas se colocaron en la suspensión final en agitación constante durante 30 minutos para lograr la adherencia del inóculo a la cubierta de las semillas (Viveganadan y Jauhri, 2000).

Se utilizó un diseño experimental bifactorial, correspondiendo el primer factor a cuatro niveles de inoculación biológica con las cepas de *Azotobacter* spp. (incluyendo un tratamiento sin inocular). El segundo factor se conformó por seis niveles de fertilización química correspondientes a: (1) nitrato de amonio, fosfopoder (producto comercial con 25 % de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) y cloruro de potasio; (2) nitrato de amonio, roca fosfórica pulverizada (11,8 % de P total) y cloruro de potasio; (3) nitrato

de amonio y cloruro de potasio; (4) fosfopoder y cloruro de potasio; (5) roca fosfórica pulverizada y cloruro de potasio; y (6) cloruro de potasio. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las dosis de fertilizantes utilizadas se calcularon en función del análisis de suelo y los requerimientos de las plantas de maíz según Ramírez et al. (1978). Se aplicó por microcosmos y según cada tratamiento 3 g de nitrato de amonio, 2 g de fosfopoder, 1,5 g de cloruro de potasio, y 2,7 g de roca fosfórica pulverizada. A los 30 días del experimento se eliminó el suelo mediante un lavado de sus raíces y las plantas se secaron a 75 °C por 72 horas, para la determinación del peso seco total. Los datos obtenidos se analizaron mediante un ANOVA bifactorial y la prueba de medias entre los diferentes tratamientos según la mínima diferencia significativa (LSD) utilizando el programa SAS (versión 8. Cary, NC). Se calculó la EAR (eficiencia agronómica relativa) para cada tratamiento, según León et al. (1986).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características físico-químicas del suelo y densidades poblacionales cultivables de los microorganismos rizosféricos totales y disolventes de fosfatos

Las mayores densidades de bacterias y hongos cultivables totales y disolventes de fosfatos de calcio se encontraron en la rizósfera de la especie de importancia agrícola *Phaseolus vulgaris* en la zona de Queniquea en un área recién talada y sembrada por primera vez (anteriormente perteneciente a un viejo cafetal de sombra) seguidas por las plantas silvestres de las minas de Monte Fresco (Cuadro 1). Esto refleja una asociación entre las densidades poblacionales microbianas y las condiciones físicas y químicas del suelo, ya que el suelo de Queniquea es el más rico en nutrientes al presentar los mayores valores de fósforo disponible, calcio, magnesio, CE, pH y porcentaje de materia orgánica; seguido por el suelo deteriorado por explotación de fosfatos cálcicos de las minas de fosfatos de Monte Fresco (Cuadro 2). Similarmente, al comparar las poblaciones rizosféricas cultivables totales y disolventes de fosfatos de calcio de la misma especie vegetal en dos suelos diferentes, como fueron los casos de *P. vulgaris* en Queniquea y en MOPROVATS, y las especies silvestres *Ageratum*

sp. y *Mimosa pudica* en la mina de roca fosfórica y en La Tuquerena (Cuadros 1 y 2) se encontró que las poblaciones microbianas disminuyeron al disminuir la calidad de las condiciones físico-químicas de los suelos estudiados. Estos resultados señalan que para una misma especie vegetal las poblaciones microbianas rizosféricas están condicionadas por las características físico-químicas del suelo, como el contenido de materia orgánica y el pH del suelo. Adicionalmente, el porcentaje de bacterias y hongos cultivables disolventes de fosfatos de calcio, como elemento de la estructura de la comunidad microbiana presentó variaciones muy propias del tipo de suelo y de la especie vegetal.

En general, las densidades cultivables de bacterias disolventes de fosfatos variaron entre 3,2 y 64,6 %, y las de los hongos disolventes de fosfatos entre 0 y 84,3 % (Cuadro 1), encontrándose para la rizósfera de las plantas silvestres de las minas de fosfatos de Monte Fresco valores absolutos altos de las poblaciones bacterianas totales y disolventes de fosfatos, mientras que éstas presentaron valores menores en la Finca de La Tuquerena, posiblemente por efecto del bajo pH, aunque los valores relativos respecto a los totales se mantuvieron muy similares. Adicionalmente, se observa que en La Tuquerena y Villa Belén, donde los suelos tienen un pH de 4,5 y 4,2, respectivamente, se favorecieron las poblaciones cultivables de los hongos disolventes de fosfatos.

Es bien conocido que en suelos ácidos los hongos son mejores competidores que las bacterias. Se ha demostrado que la estructura de las comunidades microbianas es influenciada por el pH y las condiciones nutricionales del suelo en experimentos a corto plazo, mientras que en ensayos de mayor duración las especies vegetales ejercen un efecto altamente selectivo y tan grande como el tipo de suelo debido a las cantidades y composición de los exudados radicales (Marschner et al., 2004). Las densidades poblacionales cultivables totales y disolventes de fosfatos estudiadas en el cultivo del maíz en condiciones de campo en la finca La Tuquerena se incrementaron al utilizar tres tipos de fertilizantes químicos, en relación al mismo suelo con las plantas silvestres (Cuadro 1), siendo este un experimento a corto plazo en condiciones de campo. Chiarini et al. (1998) encontraron para el

maíz cultivado en cinco suelos diferentes que la densidad microbiana rizosférica y la estructura de la comunidad variaron significativamente entre los diferentes sitios de muestreo. Igualmente, otros trabajos han demostrado que la planta no ejerce un

efecto consistente en la estructura de las comunidades microbianas de su rizósfera cuando se le compara a lo largo de un amplio grupo de suelos (Ridder-Duine et al., 2005).

**Cuadro 1.** Poblaciones microbianas cultivables totales y disolventes de HA (UFC·g<sup>-1</sup> PS) de la rizósfera de las plantas provenientes de diferentes localidades del estado Táchira ( $\bar{X} \pm SD$ ). n = 3

Localidad	Rizósfera		Bacterias			Hongos		
			Totales	Disolventes	Disolventes	Total	Disolventes	Disolventes
	Plantas cultivadas	Plantas silvestres	UFC x 10 <sup>4</sup>	HA UFC x 10 <sup>4</sup>	(%)	UFC x 10 <sup>4</sup>	HA UFC x 10 <sup>4</sup>	(%)
Minas de Monte Fresco		<i>Baccharis</i> sp.	654 ± 277,9	75,7 ± 16,6	11,6	24,6 ± 1,2	2,4 ± 0,6	9,6
		<i>Ageratum</i> sp.	5063 ± 81,0	202,5 ± 146,0	4,0	10,1 ± 0,8	1,6 ± 1,2	16,0
		<i>Iresine herbstii</i>	2218 ± 491,8	278,9 ± 143,0	12,6	21,4 ± 4,9	0,0 <sup>a</sup>	0,0
		<i>Mimosa pudica</i>	2530,6 ± 202,2	79,7 ± 18,3	3,2	6,1 ± 2,6	1,8 ± 0,5	29,5
Finca La Tuquerena		<i>Mimosa pudica</i>	16,2 ± 7,4	2,1 ± 0,0	13,0	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,2	60,0
		<i>Ageratum</i> sp.	151,3 ± 18,9	13,3 ± 4,5	8,8	4,5 ± 1,0	1,0 ± 0,4	22,4
		<i>Panicum maximum</i>	55,2 ± 6,9	2,3 ± 0,5	4,2	1,5 ± 0,2	0,2 ± 0,0	15,8
		<i>Zea mayz</i> (con K)	200,7 ± 89,6	99,3 ± 58,6	49,5	0,7 ± 0,3	0,29 ± 0,13	41,4
		(con NPK)	334,2 ± 108,1	183,6 ± 91,0	54,9	1,5 ± 0,7	1,10 ± 0,20	72,4
	(con NRK)	178,1 ± 94,6	79,9 ± 11,4	44,9	1,0 ± 0,4	0,73 ± 0,32	73,0	
MOPROVATS		<i>Phaseolus vulgaris</i>	12,7 ± 0,3	2,4 ± 0,1	18,8	15,8 ± 0,4	0,0	0,0
Queniquea		<i>P. vulgaris</i>	3850,2 ± 625,8	2486,8 ± 222,9	64,6	151,6 ± 11,5	12,7 ± 2,4	8,4
Finca Villa Belén		<i>Brachiaria decumbens</i>	180,0 ± 18,0	60,0 ± 10,0	33,3	0,83 ± 0,15	0,7 ± 0,3	84,3
		<i>Setaria</i> sp.	85,0 ± 23,0	8,0 ± 2,9	9,41	1,8 ± 0,24	0,8 ± 0,2	44,4

<sup>a</sup>Valores de las diluciones con menos de 10 UFC·mL<sup>-1</sup>

**Cuadro 2.** Análisis físico-químico de los suelos de las cinco localidades evaluadas en el estado Táchira

Característica	Zona				
	Mina de Monte Fresco	MOPROVATS-UNET	Finca La Tuquerena	Finca Villa Belén	Queniquea
Textura	Fa	Fa	Fa	FAa	Fa
Fósforo (mg·kg <sup>-1</sup> )	27	3	3	6	100
Potasio (mg·kg <sup>-1</sup> )	54	87,2	43	61	35
Calcio (mg·kg <sup>-1</sup> )	447	90,3	150	682	2253
Magnesio (mg·kg <sup>-1</sup> )	27	24,9	36	160	376
Materia Orgánica (%)	3,3	1,4	1,3	1,8	6,8
pH (1:2)	5,4	5,0	4,5	4,2	5,9
CE (1:5) dS·m <sup>-1</sup>	0,06	0,04	0,06	0,06	0,21

Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas de la Universidad Nacional Experimental del Táchira

Se ha encontrado que la fertilización con úrea no presenta un efecto significativo sobre la biomasa microbiana del suelo, pero si la rotación del cultivo, determinándose que el flujo de la biomasa microbiana del suelo está determinado

por el pH y el carbono orgánico presente en el suelo (Adeboye et al., 2006). Esto es similar a lo encontrado por Suzuki et al. (2005), quienes señalan que la fertilización orgánica tuvo poco impacto mientras que la inorgánica con amonio

ejerció un fuerte efecto sobre la estructura de las comunidades microbianas, es decir sobre la abundancia relativa de los diferentes grupos microbianos. Así, puede observarse que la aplicación de NPK en el suelo de La Tuquerena cultivado con maíz incentivó las poblaciones cultivables de bacterias en relación a la aplicación con K; sin embargo, la aplicación de NRK deprimió las mismas, posiblemente por efecto de la roca fosfórica, la cual podría estar seleccionando una microflora bacteriana específica para la disolución de este tipo de fosfatos. En este ensayo, en el que se usó el suelo ácido de La Tuquerena, se destaca que la aplicación de fertilizantes químicos incrementó grandemente la biomasa bacteriana por efecto de una mejor nutrición del maíz (Cuadro 1), produciendo cambios en la estructura bacteriana. También se observa que los hongos presentaron una mayor disposición a la disolución de este tipo de roca fosfórica en relación a las bacterias. Nelson y Mele (2007) señalan que al agregar sustratos, como B y NaCl, hay un efecto indirecto sobre la estructura de la comunidad microbiana a través de la cantidad y/o calidad de los exudados radicales, más que un efecto directo de toxicidad microbiana; igualmente, señalan que lo que determina la estructura de la comunidad microbiana en la rizósfera de la planta y un ciclo normal del N es la salud de las plantas.

#### **Efecto rizosférico de la planta sobre las densidades poblacionales de los microorganismos cultivables totales y disolventes de fosfatos**

El efecto de la ecología rizosférica propia de cada especie vegetal sobre la abundancia de las poblaciones microbianas se resalta fuertemente en los resultados obtenidos para las diferentes especies silvestres de las minas de Monte Fresco y de la Finca La Tuquerena, al igual que para los dos tipos de forrajes en la Finca Villa Belén, lo que las densidades poblacionales de bacterias y hongos cultivables disolventes de fosfatos de calcio son dependientes de la especie vegetal para un mismo suelo. Mientras que las propiedades específicas de las plantas expresadas a través de sus exudados radicales ejercen un efecto selectivo sobre los microorganismos que colonizan su rizósfera, es la totalidad de poblaciones rizo-competentes abundantemente disponibles en el suelo no-rizosférico la que más determina la

estructura de la comunidad rizosférica de la planta (Ridder-Duine et al., 2005). Es así como en el suelo de las minas de Monte Fresco, el establecimiento de plantas colonizadoras como *Baccharis* sp., *Ageratum* sp., *Iresine herbstii* y *Mimosa pudica* capaces de tolerar estas condiciones de empobrecimiento físico y químico, incentivarían la actividad microbiana de este suelo en los espacios rizosféricos por la acción de azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, mucilagos y otros metabolitos secundarios propios de la dinámica fisiológica de cada especie vegetal (Benizri et al., 2001). La producción de estas sustancias, al servir de fuente energética y de biosíntesis a los microorganismos adyacentes a la planta, ejercerán una influencia positiva o negativa sobre los mismos al inducir cambios en el pH de la rizósfera, disponibilidad de sustratos específicos, de nutrientes y de factores de crecimiento microbiano, lo que temporalmente va a moldear la estructura de la comunidad microbiana rizosférica de la planta.

Se observó que el mantenimiento de coberturas en el suelo no necesariamente aseguró una alta comunidad microbiana. Por ejemplo, en MOPROVATS la población microbiana fue baja aunque existió buena cobertura de *Panicum maximum* (Cuadro 3), una especie forrajera con un alto contenido de fibra cruda pero bajo contenido en proteína (Carranza-Montaña et al., 2003), lo que la señala como una especie con bajo valor nutricional. Contrariamente, en Queniquea las altas densidades poblacionales fueron propias de un suelo con buenas características físico-químicas y altos contenidos de sustratos orgánicos provenientes de hojas y raíces muertas de la vieja plantación de café de sombra. Esto indica que es importante considerar la calidad de la cobertura en relación a sus características bioquímicas y las relaciones C/N y C/P del material orgánico, lo que permitirá satisfacer no sólo las necesidades nutricionales de la planta sino también brindar una disponibilidad de sustratos como fuentes de energía para las poblaciones microbianas del suelo y de la rizósfera.

El efecto de los exudados rizosféricos de las plantas se pone de manifiesto en la relación R/S, presentándose los valores más altos en el suelo disturbado de la mina de fosfatos de Monte Fresco (Cuadro 4), atribuido al alto nivel de deterioro estructural y empobrecimiento nutricional del

suelo (Cuadros 2 y 3). Por el contrario, el buen estado nutricional del suelo Queniquea, se reflejó en los bajos valores de su relación R/S. Los suelos muy pobres de la finca La Tuquerena mostraron una relación R/S cercana a la unidad para las poblaciones totales tanto en las especies silvestres como en el maíz, pero para las poblaciones cultivables de bacterias y hongos disolventes de fosfatos de calcio los valores de la relación R/S fueron mayores para el maíz, y éstos a su vez muy similares a los presentados por *P. vulgaris* en el suelo de Queniquea. Esto podría indicar el rol que juegan las poblaciones de microorganismos disolventes de fosfatos en las plantas cultivadas dadas las mayores exigencias en fosfatos ocasionadas por el alto metabolismo celular de estas plantas. Este incremento de la relación R/S

de la microflora disolvente de fosfatos de calcio también podría ser causado por la fertilización química, específicamente la adición de fosfatos y la calidad y cantidad de exudados radicales producidos por el cultivo al variar las condiciones de fertilidad del suelo, lo que incentivaría el grupo funcional microbiano disolvente de fosfatos de calcio a nivel de la rizósfera. Otros trabajos reportan que la fertilización con fosfatos minerales o de alta solubilidad incentiva la presencia de los grupos funcionales microbianos disolventes de fosfatos (Reyes et al., 2002) y de grupos de hongos y bacterias mesófilas y las poblaciones de *Rhizobium* y *Azotobacter* (Pahuará y Zúñiga, 2001), entre los cuales se encuentran muchas poblaciones bacterianas disolventes de fosfatos.

**Cuadro 3.** Características agroecológicas de las cinco localidades evaluadas en el estado Táchira

Característica	Zona				
	Mina de Monte Fresco	MOPROVATS-UNET	Finca La Tuquerena	Finca Villa Belén	Queniquea
Precipitación media (mm)	903	1322	1958	1322	1212
Temperatura media (°C)	22,4	23,2	22,2	23,2	17,9
Zona de vida	Bosque Húmedo Tropical	Bosque Húmedo Premontano	Bosque Húmedo Montano Bajo	Bosque Húmedo Premontano	Bosque muy Húmedo Montano Bajo
Clasificación del suelo	Tropudults	Tropudults	Inceptisol	Tropudults	Orthents
Manejo del suelo antes del muestreo	Sin uso, pastoreo esporádico. En proceso de recuperación natural después de labores de extracción minera.	Siembra de cultivos con cobertura ( <i>Panicum maximum</i> ), en mínima labranza, sin la aplicación de biocidas	Diez años sin uso agrícola y con pastoreo esporádico	Pastoreo continuo. Aplicación anual de fertilizantes químicos	Primera siembra con <i>P. vulgaris</i> de un viejo cafetal de sombra recién talado.

**Cuadro 4.** Relaciones R/S de las poblaciones bacterianas y fúngicas cultivables totales y disolventes de hidroxiapatita de plantas provenientes de tres localidades del estado Táchira

Localidad	Tipo de planta	R/S			
		Bacterias		Hongos	
		Totales	Disolventes de HA	Totales	Disolventes de HA
Minas de Monte Fresco	Silvestres	44,00	16,00	22,00	15,00
Finca La Tuquerena	Silvestres	0,74	0,78	1,43	1,05
	Cultivadas	0,65	2,15	0,94	3,33
Queniquea	Cultivadas	4,60	3,50	5,35	3,03

### Inoculación en maíz de bacterias disolventes de fosfatos bajo condiciones de umbráculo

En el ensayo de umbráculo, al modificarse las características nutricionales iniciales del suelo de La Tuquerena mediante la aplicación de fertilizantes químicos, se observó el efecto de la introducción de bacterias exógenas fijadoras de nitrógeno de vida libre en el crecimiento del maíz (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Respuesta en peso seco y la eficiencia agronómica relativa (EAR) de las plantas de maíz a los 30 días de crecimiento en condiciones de umbráculo y sometidas a diferentes fuentes de inoculación biológica y de fertilización química (n = 3)

Fuente de fertilización		Peso seco (g)	EAR (%)
Biológica	Química		
Sin inóculo	K	2,37	
	NK	0,60	
	PK	3,40	
	RK	2,13	
	NPK	1,59	
	NRK	1,05	
MF1b	K	1,13	-52
	NK	1,30 *	117
	PK	4,90	44
	RK	4,57 *	114
	NPK	2,50	57
	NRK	1,33	27
MF5	K	2,20	-7
	NK	1,73 **	189
	PK	3,30	-3
	RK	1,80	-16
	NPK	1,67	5
	NRK	1,20	14
Inóculo mixto	K	3,00	27
	NK	1,67 **	178
	PK	3,87	14
	RK	1,53	-28
	NPK	2,43 *	53
	NRK	1,20	14

Comparación de medias del peso seco en relación al tratamiento sin inóculo para cada fuente de fertilización química, según la prueba LSD (\* y \*\* indican  $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente)

El tratamiento químico sin inóculo mostró que la fertilización con potasio y fósforo tendió a presentar el mayor incremento del peso seco de las

plantas de maíz, atribuido a una absorción intensa de estos nutrientes. En relación al nitrógeno, a pesar de ser necesario para la planta durante todo su ciclo, se observó que los pesos secos de las plantas fertilizadas con este elemento (NK, NPK y NRK) mostraron los menores valores, probablemente ocasionado por el efecto del amonio sobre una mayor acidificación del suelo lo que habría afectado negativamente el crecimiento del cultivo de maíz.

El maíz exige suelos con un pH entre 5,5 y 7,0 y en este ensayo el suelo no fue encalado. Las cepas bacterianas introducidas, *Azotobacter* MF1b, *Azotobacter* MF5 y el cultivo mixto de las mismas, produjo cambios de los pesos secos de las plantas en los tres tratamientos con nitrógeno que, aunque con valores relativamente bajos entre 1,20 hasta 2,50 g·planta<sup>-1</sup>, fueron desde incrementos ligeros a estadísticamente significativos ( $P \leq 0,01$ ) respecto a los tratamientos no inoculados (Cuadro 5). Se conoce que la mayoría de las cepas de *Azotobacter* son sensibles a las condiciones de acidez y que las altas concentraciones de nitrógeno inorgánico inhiben su fijación biológica (Deluca et al., 1996).

De los tres tratamientos biológicos, la cepa *Azotobacter* MF1b manifestó una actividad promotora del crecimiento en el sistema suelo-maíz en el tratamiento RK, incrementando significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el peso seco de las plantas con una EAR de 114 % (Cuadro 5). Cabe resaltar que las cepas MF1b y MF5 disolventes de HA *in vitro* y aisladas del suelo de las minas de fosfatos de Monte Fresco con pH 5,4 mostraron tolerancia a la acidez del suelo y mejoraron significativamente el crecimiento de las plantas de maíz bajo las condiciones adversas del suelo de La Tuquerena de pH 4,5 (Cuadro 2). De las dos cepas utilizadas en la bacterización de las semillas de maíz, *Azotobacter* MF1b, estaría mostrando la capacidad metabólica específica para la disolución de la roca fosfórica de Monte Fresco.

En general, la acción benéfica de las cepas puede expresarse en forma directa o indirecta a través de diversos mecanismos. En forma directa mediante la fijación no simbiótica de nitrógeno, la disolución de la roca fosfórica o de los fosfatos inorgánicos presentes en el suelo y la producción de hormonas de crecimiento, entre otros, y en forma indirecta al ejercer una acción benéfica sobre las poblaciones microbianas autóctonas del



suelo capaces de promover el crecimiento de las plantas (Reyes et al., 2002). De las dos cepas, *Azotobacter* MF1b parece estar más relacionada con el incremento de la asimilación de nitrógeno y de fósforo por las plantas de maíz. La acción de las dos cepas en forma mixta no generó una acción sinérgica. Cabe destacar que la fijación de nitrógeno y/o disolución de fosfatos, son características microbianas consideradas en la promoción del crecimiento de las plantas para la selección de bioinoculantes (Vessey, 2003). Estos resultados sugieren fuertemente una acción benéfica de las poblaciones bacterianas de *Azotobacter* MF1b y MF5, siendo éstas sensibles a las características nutricionales del suelo, al tipo de fertilizante químico, y capaces de influir en la dinámica de los nutrientes del suelo. Por último, se debe señalar la necesidad de continuar evaluando estas cepas microbianas en relación a la colonización rizosférica e intervención de los ciclos de nitrógeno y fósforo en plantas de importancia para la sostenibilidad agrícola.

### CONCLUSIONES

Las densidades poblacionales microbianas totales y disolventes de fosfatos se mostraron afectados por las condiciones físicas y químicas del suelo, como el pH y el contenido de materia orgánica del suelo. La ecología rizosférica propia de cada especie vegetal incidió sobre la abundancia de las poblaciones microbianas rizosféricas cultivables para un mismo suelo, y al mismo tiempo se encontró que las densidades poblacionales de bacterias y hongos cultivables disolventes de fosfatos de calcio son dependientes de la especie vegetal. El buen estado nutricional de un suelo, como en el caso de Queniquea, se reflejó en los bajos valores de la relación R/S en contraposición con los valores obtenidos en suelos con alto deterioro físico-químico como los de la mina de fosfatos de Monte Fresco. De las dos cepas exógenas introducidas en el ensayo de umbráculo con el suelo de La Tuquerena, la cepa de *Azotobacter* MF1b ejerció la mayor acción benéfica sobre el crecimiento del maíz incrementando significativamente el peso seco en determinados tratamientos con fertilización química respecto al testigo no inoculado, lo que le confiere a esta cepa un potencial de uso en la agricultura sostenible.

### AGRADECIMIENTO

Investigación financiada por el Decanato de Investigación de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), proyecto 02-001-2001.

### LITERATURA CITADA

1. Adeboye, M.K.A., E.N.O. Iwuafor y J.O. Agbenin. 2006. The effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil chemical and microbial properties in a Guinea Savanna Alfisol of Nigeria. *Plant Soil* 281: 97-107.
2. Benizri, E., E. Baudoin y A. Guckert. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Technol.* 11: 557-574.
3. Biswas, J.C., J.K. Ladha, F.B. Dazzo, Y.G. Yanni y B.G. Rolfe. 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigour and yield of rice. *Agron. J.* 92: 880-886.
4. Carranza-Montaña, M.A., L.R. Sánchez-Velázquez, M. del R. Pineda-López y R. Cuevas-Guzmán. 2003. Calidad y potencial forrajero de especies del bosque tropical caducifolio de la sierra de Manantlán, México. *Agrociencia* 37: 203-210.
5. Casanova, E. 1996. Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 380 p.
6. Chabot, R., CH. Beauchamp, J. Kloepper y H. Antoun. 1998. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biol. Bioch.* 30: 1615-1618.
7. Chiarini, L., A. Bevivino, C. Dalmastrì, C. Nacamulli y S. Tabacchioni. 1998. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Appl. Soil Ecol.* 8: 11-18.
8. Deluca T.H., L.E. Drinkwater, B.A. Wiefing y D.M. Denicola. 1996. Free-living nitrogen-fixing bacteria in temperate cropping systems:

- Influence of nitrogen source. *Biol. Fert. Soils* 23(2): 140-144.
9. Kennedy, I.R., A.T.M.A. Choudhury y M.L. Kecskes. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36: 1229-1244.
10. Kloepper, J. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). *In: Azospirillum/ Plant Association.* Okon J. (ed.). Boca Ratón, Fl. CRC Press. pp. 137-16.
11. León, L.A., W.E. Fenster y L.L. Hammond. 1986. Agronomic potential of eleven phosphate rocks from Brazil, Colombia, Perú, and Venezuela. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 798-802.
12. Marschner, P., D. Crowley y C. Hong Yang. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261: 199-208.
13. Narula, N., V. Kumar, B. Singh, R. Bhatia y K. Lakshminarayana. 2005. Impact of biofertilizers on grain yield in spring wheat under varying fertility conditions and wheat-cotton rotation. *Arch. Agron. Soil Sci.* 51(1): 79-89.
14. Nelson, D.R. y P.M. Mele. 2007. Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biol. Biochem.* 39: 340-351.
15. Nikitina, V.E., N.V. Bogomolova, E.G. Ponomareva y O.I. Sokolov. 2004. Effect of *Azospirilla* lectins on germination capacity of seeds. *Biol. Bull.* 31(4): 354-357.
16. Pahuara-Hernández, D. y D. Zúñiga-Dávila. 2002. Efecto del fósforo sobre la población microbiana en suelos con pasturas en la zona altoandina de Junín. *Ecología Aplicada* 1(1): 57-64.
17. Primavesi, A. 1984. Manejo Ecológico del Suelo. Editorial El Ateneo. Buenos Aires.
18. Ramírez, R., M.L. Bandre y N. Rosales. 1978. Nutrición del maíz en Venezuela I. Respuesta del maíz al nitrógeno, fósforo y potasio y su composición foliar en la zona maicera del estado Aragua. *Agronomía Tropical* 28(1): 19-29.
19. Reyes, I., L. Bernier, R.R. Simard, P. Tanguay y H. Antoun. 1999. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microb. Ecol.* 28: 291-295.
20. Reyes, I., L. Bernier y H. Antoun. 2002. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microb. Ecol.* 44: 39-48.
21. Reyes, I., A. Valery y Z. Valduz. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soil of colonizer plants at abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil* 287: 69-75.
22. Ridder-Duine, A.S., G.A. Kowalchuk, P.J. Klein Gunnewiek, W. Smant, J.A. van Veen y W. de Boer. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biol. Biochem.* 37: 349-357.
23. Rodríguez, H. y R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
24. Suzuki, C., T. Kunito, T. Aono, C.T. Liu y H. Oyaizu. 2005. Microbial indices of soil fertility. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1062-1074.
25. Vessey, K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
26. Viveganadan, G. y K.S. Jauhri. 2000. Growth and survival of phosphate-solubilizing bacteria in calcium alginate. *Microbiol. Res.* 155: 205-207.