BIOFERTILIZANTE MIXTO A BASE DE BACTERIAS DE VIDA LIBRE FIJADORAS DE NITRÓGENO Y SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO.

Abreu M. Y.J. y Ferreira C.J.J.

MPPAT. Instituto de Salud Agrícola Integral INSAI. Laboratorio Comunal de Producción de Biofertilizantes “Bolívar Conservacionista” Calabozo-Guárico. Venezuela yelitzajam@gmail.com. Jennifer.ferreira28@gmail.com.

RESUMEN

Se presentan los resultados de las pruebas de calidad de un biofertilizante mixto a base de bacterias solubilizadoras de fósforo (SF) y fijadoras de nitrógeno de vida libre (FNVL), desarrollado en el Laboratorio Comunal de Producción de Biofertilizantes Bolívar Conservacionista del INSAI-Guárico. El objetivo fue obtener un biofertilizante mixto a partir de cepas nativas con potencial para fijar nitrógeno y solubilizar fósforo para ser utilizado en cultivos de interés socioproductivo en el estado Guárico. La viabilidad y calidad se determinó a través de la reacción a la Tinción Gram (TG), el pH y la densidad óptica (DO). Los valores promedios de pH y DO obtenidos para la mezcla fueron: 5,423 y 2,4358 respectivamente, se infiere que la cepa FNMG1 predominó en el biofertilizante mixto, ya que los valores de la mezcla se aproximaron a los del preinoculo de la cepa FNVL, con pH de 5,66 y DO de 3,0662.

Palabras claves: Biofertilizantes mixtos, cepas nativas, nitrógeno, fósforo.

INTRODUCCIÓN

Los biofertilizantes son insumos biológicos a base de microorganismos que viven en el suelo o en la planta y que cumplen funciones directas o indirectas en la nutrición de ésta, bien sea, supliendo, captando o haciendo disponible elementos esenciales para los cultivos, así como, suministrándole sustancias de crecimiento y de defensa ante condiciones de estrés biótico o abiótico (López, 2010). Estos bioinsumos representan una opción para reducir el uso de fuentes de nitrógeno y fósforo de origen industrial, lo cual es muy importante en el manejo integrado de los cultivos cereales y hortalizas que se cultivan en el estado Guárico.

Casanova (1996), hace referencia a los microorganismos asociados a las raíces y que viven en el área de contacto suelo-raíz comúnmente denominada rizosfera. También señala a los organismos que pueden formar asociación más estrecha y vivir en la superficie de las raíces y a los que pueden invadir las células de las raíces donde pueden vivir en simbiosis. El mismo autor afirma que como respuesta a condiciones del suelo, algunas plantas pueden cambiar el pH de la rizósfera, es decir, que en suelos ácidos el pH de esta zona puede aumentar hasta en una unidad, mientras que en suelos neutros es posible que la rizósfera tienda a ser ácida. Generalmente, las bacterias dominan en sus funciones e importancia en el suelo a los hongos, algas y actinomicetos ya que, existen procesos de los cuales ellas son las únicas responsables, como la oxidación del Nitrógeno, azufre y la fijación simbiótica y no simbiótica del nitrógeno en las plantas.

En Venezuela se dispone de una oferta biotecnológica con cepas nativas en diferentes fases de evaluación de su efectividad y compatibilidad: cepa-suelo-cultivo, así como una red de 28 laboratorios de investigación, innovación y producción de biofertilizantes

y biocontroladores adscritos al INSAI e INIA, entre otros privados y comunitarios (López et al., 2009; López, 2010a).

La producción de biofertilizantes a base de bacterias se ha venido desarrollando en el INSAI e INIA empleando medios de cultivos específicos para la bacteria que se desea multiplicar. En este sentido, actualmente se producen cuatro líneas de biofertilizantes a base de bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, y *Bacillus megatherium*, es decir, biofertilizantes individuales. En este trabajo se evaluó el consorcio con cepas nativas de *Azotobacter* y *Bacillus megatherium* con la finalidad de obtener un biofertilizante mixto para ser utilizado en cultivos de interés socioproductivo tales como los cereales, hortalizas, pastos y frutales en el estado Guárico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación: El experimento se llevó a cabo bajo condiciones controladas en el Laboratorio Comunal de Producción de Biofertilizantes Bolívar Conservacionista, perteneciente a la RED de Laboratorios de Bioinsumos del INSAI, ubicado en el Municipio Francisco de Miranda.

Cepas evaluadas: Se emplearon 2 cepas madres: FNMG1 Fijadora de Nitrógeno de vida libre (FNVL) y SFMG1 Solubilizadora de Fósforo (SF), aisladas de un agroecosistema sorgo-frijol del estado Guárico, provenientes del Cepario Nacional de Biofertilizantes ubicado en el INIA-CENIAP-Maracay.

Preparación del Preinoculo (PI): Para la obtención del preinoculo se siguió los métodos y procedimientos propuestos por Martínez *et al* (2006). Se utilizaron replicas frescas de las cepas madres, cada una con 24 horas de incubación a 34 °C y sembradas en tubos de ensayo en los medios de crecimiento específicos: Ashby para *Azotobacter* (FNVL) y Pikovskaya para SF *Bacillus megatherium*, se realizaron tres repeticiones por cada cepa. Se preparó 500 ml de preinoculo por cepa. Posteriormente, cada preinoculo se agitó a 160 rpm por 24 horas. Luego de la fermentación del preinoculo se determinaron los parámetros de calidad: Tinción de Gram (TG), pH y densidad óptica (DO) a través de un fotocolorímetro a 550 nm.

A partir de las diluciones 10^7 , 10^8 y 10^9 , se realizaron siembras por triplicado en placas de Petri por el método de siembra profunda, utilizando los medios Ashby y Pikovskaya para los preinoculo FNMG1 (FNVL) y SFMG1 (SF) respectivamente, luego se colocaron en incubación por 48 horas a 34 °C, simultáneamente se incubaron por triplicado muestras control como testigos con los medios de cultivo Ashby y Pikovskaya sin inoculos. Con la finalidad de obtener posibles colonias contaminantes, se realizó siembras con la dilución 10^7 en medio agar nutriente.

Los conteos finales se realizaron como unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/ml). Para la obtención del biofertilizante mixto a base de SF y FNVL se inoculó 10 litros de medio mezcla (Ashby + SF) a razón de 50 ml de cada preinoculo/1L de medio mezcla (biofertilizante mixto), el preinoculo representa el 10% del volumen final. Luego de inocular el medio mezcla se colocó en agitación a 160 rpm por 24 h para su fermentación. Posteriormente se determinaron los parámetros de calidad: TG, pH y DO igual que en el preinoculo. Por último, se sembró por el método de siembra profunda las diluciones 10^7 , 10^8 y 10^9 en placas de Petri por triplicado con medio Ashby para realizar conteo de colonias de *Azotobacter* en medio Pikovskaya para conteo de colonias

Bacillus megaterium y en medio Mezcla (Asbhy + Pikovskaya) para conteo de colonias de *Azotobacter* y *Bacillus megaterium* se incubaron por 48 h a 34 °C, luego se obtuvo la concentración en UFC/ml. Los datos se procesaron utilizando el programa estadístico STATISTIX Ver. 8.0, para su interpretación por medio de estadística descriptiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros de calidad obtenidos tanto para los Preinoculos de (FNVL-*Azotobacter* y (SF-*Bacillus megatherium*) como para la mezcla de ambas cepas, se presentan en el Cuadro 1. Se puede observar que los valores promedios del biofertilizante mixto con la mezcla (SF+FNVL) presenta un valor de pH de 5,42 y una densidad óptica (DO) de 2,4358, valores muy semejantes a los obtenidos para la cepa FNVL, cuyo pH fue de 5,66 y la DO fue 3,0662 por lo que se infiere que ésta cepa predominó en la mezcla, es decir, que la mezcla de los medios de producción (Medio Asbhy + Medio SF) favoreció el desarrollo de la cepa FNMG1 (FNVL). Sin embargo, en el cuadro 2 se presentan los valores de concentración UFC/ml para la Mezcla y los Preinoculos. Al comparar el crecimiento de las colonias de forma individual se obtuvo que la cepa SF proveniente de la Mezcla predominó, es decir, que se obtuvo más unidades formadoras de colonias/ml ($2,23 \times 10^9$). Cabe destacar, que el crecimiento de las colonias tanto en la cepa FNVL con $1,13 \times 10^9$ UFC/ml, como la SF con $2,27 \times 10^9$ UFC/ml aumentó en la Mezcla con respecto al PI de la cepa FNVL: $1,02 \times 10^9$ UFC/ml y el PI de la cepa SF: $1,32 \times 10^9$ UFC/ml en el cual las cepas están en medios específicos para su crecimiento, sin competencia por los nutrientes.

Cuadro 1. Valores de los parámetros de calidad obtenidos para el Preinoculo (PI) y la Mezcla.

Biopreparado	PARÁMETROS DE CALIDAD		
	pH	DO 550 nm	TINCIÓN DE GRAM
PI (FNVL)	5,66	3,0662	NEGATIVA
PI (SF)	4,57	1,0754	NEGATIVA
Mezcla Fiola:1	5,43	2,4728	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 2	5,34	2,541	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 3	5,33	2,4696	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 4	5,49	2,3362	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 5	5,43	2,4288	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 6	5,43	2,3644	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 7	5,37	2,4262	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 8	5,42	2,4568	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 9	5,46	2,3224	NEGATIVA
Mezcla Fiola: 10	5,53	2,5400	NEGATIVA
PROMEDIO MEZCLA	5.42	2,4358	/
Mezcla Fiola: Control	6,11	1,5672	Ausencia de bacterias <i>Azotobacter</i> y <i>Bacillus megatherium</i>

Cuadro 2. Contenido de Unidades Formadora de Colonias (UFC/ml) en el preinoculo (PI) y el biofertilizante mixto (mezcla) de cepas.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	REPETICIONES	DILUCIONES			[] (UFC/ml)
			10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
PI FNVL	Asbhy	R1	104	13	5	1,02X10 ⁹
		R2	106	18	7	
		R3	98	18	2	
		PROMEDIO	102,6	16,6	4,6	
PI SF	Pikovskaya	R1	144	23	3	1,32X10 ⁹
		R2	120	14	1	
		R3	132	33	3	
		PROMEDIO	132	23,3	2,3	
MEZCLA FNVL	Asbhy	R1	112	68	14	1,13X10 ⁹
		R2	124	56	18	
		R3	104	60	16	
		PROMEDIO	113,33	61,33	16	
MEZCLA SF	Pikovskaya	R1	210	76	10	2,27X10 ⁹
		R2	252	70	9	
		R3	320	72	14	
		PROMEDIO	227,33	72,66	2,27	
MEZCLA FNVL	MEZCLA Asbhy+ Pikovskaya	R1	0	0	10	12,33X10 ⁹
		R2	0	0	10	
		R3	0	0	17	
		PROMEDIO	0	0	12,33	
MEZCLA SF	MEZCLA Asbhy+ Pikovskaya	R1	232	68	11	2,23X10 ⁹
		R2	232	68	11	
		R3	206	72	8	
		PROMEDIO	223,33	69,33	10	

Cuadro 3. Variables obtenidas por medio de estadística descriptiva para valores de pH y DO del Biofertilizante Mixto (mezcla).

Variables estadísticas	DO	pH
Media	2.4358	5.4230
Desviación estándar	0.0767	0,0631
Varianza	5.877E-03	3.979E-03
Coefficiente de Variación	3.1473	1.1632
Valor mínimo	2.3224	5.3300
Mediana	2.4428	5.4300
Valor Máximo	2.5410	5.5300
N	10	10

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos arrojaron concentraciones UFC/ml significativas en la dilución 10⁻⁷ del biopreparado denominado Mezcla (mixto), tomando como referencia que son significativas las UFC/ml entre 100 y 300 colonias por repetición. Es importante resaltar que la concentración de las cepas: FNMG1 y SFMG1 fue mayor cuando se mezclaron, con respecto a la concentración obtenida en medios específicos individuales. Sin

embargo, tanto el valor promedio de pH: 5.4230 y la DO: 2.4358 del Biopreparado en la mezcla se aproximaron al pH: 5,66 y la DO: 3,0662 del *Azotobacter* (FNVL). En cuanto al medio mezcla para conteo de viables, sólo se pudo observar la presencia de las dos bacterias en la dilución 10^{-9} , se infiere que a partir en las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} predominó el crecimiento de bacterias SF inhibiendo el crecimiento de bacterias FNVL. Cabe destacar que el coeficiente de variación para los valores de pH indica que hubo mayor homogeneidad de los mismos en comparación con el coeficiente de variación de la DO.

BIBLIOGRAFÍA

- CASANOVA, E. (1996). Introducción a la ciencia del suelo. Universidad Central de Venezuela. CDCH. Caracas, Venezuela. 379 p.
- LÓPEZ, M. (2010). Manejo agroecológico del sistema sorgo-frijol. Efecto sobre la fertilidad del suelo y microorganismos con potencial para biofertilizar agroecosistemas venezolanos. Tesis de doctorado. Postgrado en Ciencia del Suelo. Universidad Central de Venezuela. 210p. Más anexos.
- LÓPEZ, M. (2010 a). Fundamentos conceptuales y consideraciones técnicas de los biofertilizantes. Algunas experiencias en el uso de biofertilizantes en Venezuela. Seminario Binacional Hacia la Fertilización Integral de los cultivos en la Región Andina. Sociedad Venezolana de la Ciencia del Suelos, Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, UNER, PQUIVEN. San Cristóbal, estado Táchira, 11 y 12 de noviembre, 2010, 6p.
- LÓPEZ, M., B. RODRIGUEZ y A. BOLÍVAR. (2009). Estrategias del Estado Venezolano para consolidar el uso de biofertilizantes en la agricultura. XVIII Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo. Simposio: Biofertilizantes ventajas y riesgos, Santa Bárbara del Zulia, del 09 al 13 de marzo del 2009.4p.
- MARTÍNEZ V., R., M. LÓPEZ, M. BROSSARD, G. TEJADA, H. PEREIRA, C. PARRA, J. RODRÍGUEZ, y A. ALBA. (2006). Procedimientos para el Estudio y Fabricación de Biofertilizantes Bacterianos. Maracay, Ven., Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 88p. (Serie B N° 11) 81p.