

EFFECTO DE BIOFERTILIZANTES BACTERIANOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN CULTIVAR DE MAÍZ EN DOS SUELOS CONTRASTANTES VENEZOLANOS¹

BACTERIAL BIOFERTILIZERS EFFECT ON THE GROWTH OF A MAIZE CULTIVAR IN TWO VENEZUELAN CONTRASTING SOILS¹

Marisol López*, Rafael Martínez Viera**, Mariluz Brossard Fabrè**, Angela Bolívar**, Nidia Alfonso***, Amelia Alba**** y Heydi Pereira Abreo**

¹ El proceso de investigación fue financiado por INIA, proyecto ID-ARA-05-710; FONACIT, S1-2002000391 y el Convenio de Cooperación Cuba-Venezuela –MPPAT-INIA.

* Investigadora y ** Técnicos Asociados a la Investigación. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apdo. 4579, Maracay, estado Aragua. Venezuela. Email: mlopez@inia.gob.ve

RESUMEN

En experimentos de invernadero se evaluó el efecto de cepas nativas fijadoras de N₂ (FN) de forma asociativa y solubilizadora de fósforo (SF) sobre el crecimiento de maíz cv INIA-SQ-1. Se utilizaron dos suelos, un Haplusterts de alta fertilidad (suelo A) y un Typic Paleustults de baja fertilidad (suelo B). Se evaluaron 8 tratamientos: **T1:** 0N + 100% P + 100% K; **T2:** 100% N + 100% P + 100% K; **T3:** 70% N + 100% P + 100% K + inóculo de FN; **T4:** 70 % N + 50% P + 100% K + inóculo de FN + inóculo de SF; **T5:** 100% N + 0 P + 100% K; **T6:** 100% N + 50% P + 100% K + inóculo de SF; **T7:** 100% N total + 0P + 100% K + inóculo de SF; **T8:** 0N + 0P + 0K. El porcentaje de nutrimentos se refiere a las dosis de N, P₂O₅ y K₂O recomendadas para maíz en cada suelo. La dosis de biofertilizante (ml/pote) fue de 50 de FN y 50 de SF. Hubo efecto EPR (rizobacterias promotoras de la emergencia) con la cepa FN en el suelo A, lográndose 30% más de germinación y 24% más de plantas con primera hoja verdadera a los 6 días. En el suelo B el efecto fue más tardío. La evaluación de altura de la planta, diámetro del tallo, largo y ancho de la hoja y biomasa de raíces y partes aéreas puso de manifiesto la efectividad de la inoculación con bacterias FN en ambos suelos y la de SF en el de baja fertilidad (B). Se demostró el efecto Plant Growing Promoting Rhizobacterial (PGPR) de las bacterias en el suelo B. El análisis del contenido de N y P en las plantas ratificó los resultados.

Palabras Clave: Biofertilizantes, *Zea mays*; suelo; fertilidad; *Azotobacter*; *B. megatherium*.

SUMMARY

The effect of native strains of associative nitrogen-fixing (NF) and phosphorus-solubilizing (PS) bacterias on the growth of maize cultivar INIA-SQ-1, was evaluated in greenhouse experiments, in an Haplusterts soil of high fertility (Soil A) and a Typic Paleustults soil of low fertility (Soil B). We evaluated eight treatments: **T1:** 0N + 100%P + 100% K; **T2:** 100% N + 100% P + 100%K; **T3:** 70% N + 100% P + 100% K + strain of NF; **T4:** 70% N + 50%P + 100%K + strain of NF + strain of PS; **T5:** 100% N + 0 P + 100% K ; **T6:** 100% N + 50% P + 100% K + strain of PS; **T7:** 100% N total + 0P + 100% K + strain of PS; **T8:** 0N + 0P + 0K, where the percentages in each treatment represent the proportion of the nutrient recommended in each soil in accordance with its fertility. The biofertilizers doses were 50 ml/pot of NF and PS respectively. In the soil A the NF strain acted as an emergence promoting rizobacterial: in this soil there was 30 and 24% more germination and plants with the first true leaf at the 6 days than in the soil B. The plant high, stem diameter, leaf long and wide, root and aerial biomass showed the effectiveness of NF in both soils, and the effectiveness of PS in the soil B. The effect of NF and PS on Plant Growing Promoting Rhizobacterial (PGPR) was demonstrated in the soil B. The content of N and P in plant tissue confirmed the results.

Key Words: Biofertilizers; *Zea mays*; soil; fertility; *Azotobacter*; *B. megatherium*.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela se adelantan acciones institucionales e interdisciplinarias dirigidas a redimensionar y reorientar las prácticas de manejo convencionales basada en altos insumos, que incluye altas aplicaciones de fertilizantes inorgánicos en los principales agrosistemas del país. Este manejo ha ocasionado degradación en todos los componentes del sistema (Torres *et al.*, 2005; 2006; López *et al.*, 2006; 2007).

Los daños ambientales y la disminución en la calidad de vida de los productores y consumidores hacen necesaria la búsqueda de otras opciones de manejo que contribuya a una agricultura más sana. En este contexto, la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, en el artículo 305 hace énfasis en la necesidad de promover la agricultura sustentable como base estratégica del desarrollo rural integral. En este sentido, se articulan acciones de cooperación nacional e internacional para desarrollar el uso de los biofertilizantes entre las tecnologías más promisorias para incrementar la productividad del suelo con bajo impacto ambiental.

Los biofertilizantes y bioestimuladores representan un componente vital de los sistemas agrícolas sustentables, constituyendo un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable, permitiendo reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos del suelo debidamente seleccionados, capaces de aportar a los cultivos nitrógeno fijado de la atmósfera, fósforo transformado a partir del que está fijado en el suelo y sustancias fisiológicamente activas que, al interactuar con la planta, ocasionan una mayor activación del metabolismo (Burdman *et al.*, 2000; Bauer, 2001).

El desarrollo de biotecnologías alternativas como los biofertilizantes, requieren de estrategias y procesos de investigación e innovación a corto y mediano plazo, los cuales incluyen aislamientos de cepas, evaluación, selección, multiplicación y producción.

Con el objetivo de conocer la efectividad de cepas aisladas de agroecosistemas venezolanos, se iniciaron experimentos con distintos cultivos de interés económico en suelos contrastantes. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en dos experimentos conducidos en invernadero, con el fin de conocer el efecto de las cepas autóctonas: *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum* y *Azotobacter* sp., seleccionadas como bacterias solubilizadoras de fósforo del suelo (SF) y fijadoras de nitrógeno

atmosférico de forma asociativa (FN), respectivamente, sobre el crecimiento de un cultivar de maíz, *Zea mays*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de experimentos

La fase experimental se desarrolló en un invernadero enfriado con cortinas de agua, ubicado en el INIA-CENIAP, Maracay, estado Aragua.

Suelos utilizados en la evaluación

Se utilizaron dos 02 tipos de suelos provenientes de agroecosistemas venezolanos. Uno de alta fertilidad natural, Haplusterts, del estado Barinas, el cual se denominó **Suelo A**. Otro suelo de baja fertilidad natural, clasificado como: Typic Paleustults, francosa gruesa, caolínica, isohipertérmica (Rey, 2003), proveniente del estado Guárico –Venezuela, el cual se denominó **Suelo B**. Las características de estos suelos se muestran en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Características físico-químicas de los suelos utilizados en los experimentos.

Característica	Suelo A (alta fertilidad)	Suelo B (baja fertilidad)
Arena (%)	30	60
Limo (%)	56	28
Arcilla (%)	14	12
Textura	FAL	Fa
Da (Mg m ⁻³) *	1,66	1,70
pH: Relación suelo agua:		
1: 2,5	6,66	4,6
P disponible (mg kg ⁻¹)	23	2,5
K (mg kg ⁻¹)	254	20
Ca (mg kg ⁻¹)	1176	46
Mg (mg kg ⁻¹)	344	17
M.O. (%)	3,16	0,54

Análisis realizados en la unidad de laboratorios de suelo del INIA-CENIAP. * = Da **suelo A**: Base de datos Recursos Agroecológicos. Evaluación de Tierras. CENIAP-INIA. **Suelo B**: (López *et al.*, 2006).

Muestreo de suelo

Las muestras de suelo fueron extraídas a las profundidades de 0-15 cm y 0-20 cm en un lote de producción mantenido en barbecho, específicamente en la rizosfera de la leguminosa nativa añil (*Indigosfera lespediciodes*) en período de floración, en un suelo ácido de sabana bien drenada. Las submuestras fueron mezcladas y homogeneizadas. Se utilizaron muestras compuestas a cada profundidad para hacer análisis y aislamientos de microorganismos. Las muestras de 0-15 cm fueron procesadas para realizar los aislamientos de cepas SF y FN y las muestras de 0-20 cm fueron utilizadas para determinaciones con fines de diagnóstico de fertilidad inicial a fin de hacer los cálculos de dosis de fertilización inorgánica a ser aplicada.

Aislamiento de cepas

Las cepas utilizadas fueron aisladas de un agroecosistema sorgo-frijol del estado Guárico, siguiendo los procedimientos y métodos propuestos por Martínez *et al.* (2006).

Aproximadamente 50 g del suelo muestreado en la rizosfera fue llevado al laboratorio para realizar los aislamientos correspondientes.

Aislamiento de cepas fijadoras de nitrógeno (FN) de vida libre

Se pesó 1 g de suelo colectado de la rizosfera del agrosistema seleccionado, luego se realizaron diluciones hasta 10^{-6} , de esta última dilución se extendió 0,1 ml en cajas de Petri con medio de cultivo Ashby, a los 5 d se contaron las colonias y se realizó aislamiento de las colonias seleccionadas en tubos de ensayo con el mismo medio de cultivo.

Aislamiento de cepas solubilizadora de fósforo (SF)

Se pesó 1 g de suelo rizosférico, se suspendió en agua estéril y se realizaron diluciones hasta 10^{-9} , luego se extendió 0,1 ml en cajas Petri conteniendo medio de cultivo Pikovskaya y se incubó durante 5 d, posteriormente se aislaron las colonias que formaron halo transparente -como indicador de capacidad de solubilizar fósforo- Estas cepas fueron utilizadas para preparar el biofertilizante o preinoculo utilizado en el experimento.

Preparación del biofertilizante o preinoculo

El preinoculo se preparó a partir de las cepas FN y SF, previamente aisladas en los medios Ashby y Pikovskaya,

respectivamente, sembradas en medios de cultivo 48 h antes de ser utilizadas. Se trabajó con una relación Vf/Vm de 10:1. Donde Vf = volumen del frasco y Vm =volumen del medio, siguiendo las recomendaciones sugeridas por INIA (2005).

Adecuación del suelo para experimentos

Los suelos A y B fueron secados, mezclados, homogeneizados y tamizados por una malla de 4 mm. Aproximadamente 1 kg se llevó al laboratorio para realizar análisis con fines de fertilización. Posteriormente, se pesaron porciones de 3 kg de suelo. Antes de colocar el suelo en cada unidad experimental, los pots fueron cubiertos con bolsas de polietileno resistentes, bien ajustada al envase (potes), con el fin de evitar pérdidas de suelo rizosférico por drenaje y que las raíces salieran del pote y se rompieran. Luego se aplicaron los tratamientos correspondientes y se sembró el cultivar seleccionado como indicador.

Cultivo indicador: Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento del cultivo se utilizó la especie *Zea mays*, cultivar: cv INIA-SQ-1, proveniente del banco de germoplasma del INIA-CENIAP.

Siembra: En cada pote o pote se sembraron 4 semillas de maíz, al germinar, se eliminaron dos plántulas, dejándose dos por pote hasta la cosecha.

Riego: El riego se aplicó diariamente, variando la cantidad en cada suelo, de acuerdo a la capacidad de retención de humedad y dependiendo la edad del cultivo, las aplicaciones de agua variaron entre 25 ml al inicio del experimento, hasta 250 ml durante la última semana del experimento. La aplicación de riego se realizó dos veces al día, principalmente en el suelo B; en el suelo A (mayor retención de humedad), algunas veces se aplicó una sola vez al día.

Manejo de la fertilización

Se utilizaron dosis de nitrógeno, fósforo y potasio inorgánico de acuerdo a los resultados de análisis de los suelos A y B realizado con fines de fertilización. Se calcularon las dosis considerando los requerimientos del cultivo, según lo establecido en los instructivos o tablas de doble entrada propuestas por INIA (2005) para maíz de secano zona central y para zonas maiceras del estado Guárico (Quintero, 1991) adaptado por Alfonso, (2003) citadas en manual de fertilización INIA (2005).

Fuentes de abonos inorgánicos aplicados

Nitrógeno: urea (46 % de N); fósforo: RFR= roca fosfórica de Riecito micronizada (14% P-total; 39% de CaO; eficiencia agronómica entre 80-90%; P-soluble 9,98% P₂O₅ en citrato de amonio neutro); **potasio:** cloruro de potasio (60% K₂O).

Fertilizantes biológicos

Se utilizó inóculos de la bacteria FN *Azotobacter* sp., aislada de un suelo ácido de sabana del estado Guárico y seleccionada por mostrar mayor eficiencia FN en las pruebas de efectividad realizadas previamente por equipo de investigación del sub proyecto: ID-ARA-05-710. INIA-CENIAP.

Igualmente, se inoculó con bacterias solubilizadoras de fósforo (SF), utilizando la cepa de *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum*, también aislada de un suelo ácido del estado Guárico. Ambos inóculos fueron preparados en medio Dimargon (Dibut *et al.*, 2003).

Identificación taxonómica de cepas

Las cepas fueron identificadas por equipo de investigación de fitopatología INIA-CENIAP¹

Dosis de biofertilizante aplicada

Los inóculos se aplicaron a razón de 50 ml/pote, después de la siembra, en los tratamientos T3, T4, T6 y T7, correspondientes.

Dosis de N, P₂O₅ y K₂O aplicados en mg pote⁻¹ en cada suelo

Suelo A:

Nitrógeno: 0 mg en T1 y T8; 109 mg (100 % de la dosis recomendada) en los tratamientos T2, T5, T6 y T7 y 77 mg (70% de N recomendada) en los tratamientos T3 y T4.

Fósforo: 0 mg en T5, T7 y T8; 66 mg (100 % dosis recomendada) en T1, T2 y T3 y 33 mg (50 % dosis recomendada) en los tratamientos T4 y T6.

Potasio: se aplicó 45 mg (100% de dosis recomendada) en todos los tratamientos: T1-T8.

Suelo B:

Nitrógeno: 0 mg en T1 y T8; 117 mg (100% de la dosis recomendada) en los tratamientos T2, T5, T6 y T7 y 82 mg (70% N) en los tratamientos T3 y T4.

Fósforo: 0 mg en T5, T7 y T8; 78 mg (100% de P recomendada) en los tratamientos T1, T2 y T3; y 39 mg (50% de P recomendada) en T4 y T6.

Potasio: Se aplicó 44 mg (100% dosis recomendada) en todos los tratamientos.

Nota: Dosis recomendada se refiere a la dosis sugerida en los laboratorios de servicio de suelos de acuerdo a los resultados de análisis de suelo y los criterios utilizados (tabla de doble entrada) para maíz INIA (2005).

Forma de aplicación de fertilizantes

Los fertilizantes inorgánicos y biológicos fueron aplicados como solución nutritiva alrededor de las semillas, distribuyendo en forma homogénea en cada pote o pote la dosis establecida.

Tratamientos evaluados

T1: 0N + 100%P +100% K; **T2:** 100% N +100% P+100%K; **T3:** 70%N+100% P+100% K + inoculo de FN; **T4:** 70 %N +50%P +100%K + inoculo de FN + inoculo de SF. **T5:** 100%N + 0 P +100% K ; **T6:** 100%N + 50% P+100% K+ inóculo de SF; **T7:** 100%N total+ 0P+100% K + inoculo de SF; **T8:** 0N + 0P + 0K. La dosis de inoculo fue de 50 ml/pote tanto para fijadora de nitrógeno (FN) como para solubilizadora de fósforo (SF). Esta dosis corresponde a 2 litros⁻¹, de acuerdo a la calidad del producto (Martínez-Viera *et al.*, 2006).

Pruebas de germinación

Se realizó un recuento de las semillas germinadas en los tratamientos: testigo (sin inoculo), con cepa fijadora de nitrógeno y con cepa SF entre los 4 y los 10 días después de la siembra (DDS), así como del número de plantas en las que apareció la primera hoja verdadera (hoja bandera) antes de los 7 d y hasta los 10 d (INIA, 2006).

Cosecha: A los 45 DDS se cosecharon los experimentos, separando las plantas completas del suelo; a cada planta se le realizaron las siguientes evaluaciones: número total

¹ Investigadora. Ana Masselli. Comunicación personal. Laboratorio de Fitopatología del INIA-CENIAP

de hojas, largo y ancho promedio de las hojas, longitud y diámetro del tallo y peso seco de la parte aérea y de las raíces.

Análisis foliar

Al momento de la cosecha se colectaron submuestras de tejido foliar por tratamiento. Las muestras de tejido foliar por tratamiento fueron secadas en estufa hasta obtener peso constante y luego molidas y digeridas con $H_2SO_4 - H_2O_2$ al 30%; el N-total fue determinado utilizando el método de salicilato de sodio y el fósforo fue determinado utilizando el método e Nitrovanadato-Molibdato (Complejo amarillo); ambos elementos fueron cuantificados leyendo directamente en un espectrofotómetro de UV visible. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de suelo planta del INIA-Guárico.

Metodologías utilizadas en las determinaciones con fines de fertilización del suelo

Los análisis se realizaron según los siguientes métodos (Gilabert *et al.*, 1990): Textura: distribución y tamaño de la partícula (Bouyoucos); pH (Relación suelo agua: 1: 2,5); Fósforo (Olsen); Potasio (Olsen); Calcio (Morgan); Materia orgánica (Combustión humedad, Walkey and Black modificado); y CE (ms/cm 25 °C conductímetro).

Diseño experimental y análisis estadístico: Se utilizó un diseño de bloques al azar. En total se evaluaron 8 tratamientos, los cuales se repitieron 6 veces, originándose 48 unidades experimentales. Los resultados de análisis de suelos y plantas se homogenizaron y analizaron estadísticamente, utilizando la Prueba de Medias Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 2 se presenta el efecto de los dos biofertilizantes evaluados (FN y SF) sobre la germinación de las semillas y sobre el tiempo de aparición de la primera hoja verdadera, utilizando este dato como posible indicador de precocidad. Los tratamientos que contenían inoculos fueron comparados con el testigo (sin inóculo).

Puede observarse el efecto estimulador de ambos biofertilizantes sobre la germinación y la precocidad del desarrollo del maíz, tanto en el suelo A, de alta fertilidad como en el suelo B de baja fertilidad, aunque la acción es diferente en cada suelo.

A partir de cepas FN de forma asociativa, se observa un alto porcentaje de germinación a los 4 d DDS en el suelo A, encontrándose 75% de las semillas germinadas en comparación con 52% obtenido en el tratamiento sin inocular, siendo estadísticamente significativo el efecto de la cepa FN con relación al testigo y a la cepa SF; 2 días después germinó el 96% de las semillas, lo cual superó significativamente los tratamientos de referencia, mientras que en el tratamiento sin inocular, entre los 5 y 8 d sólo se había alcanzado el 66% de germinación.

En el suelo B, no se encontró efecto de las cepas (SF y FN) durante los primeros 4 d. El efecto estimulador de crecimiento se observó en los siguientes 4 d de evaluación con la cepa FN. La estimulación del crecimiento no se manifestó de inmediato en el suelo B de baja fertilidad, quizás porque sus características de muy baja fertilidad, reducen la velocidad de multiplicación de la población bacteriana que se aplicó, lo cual hace que su acción beneficiosa no pueda ejercerse todavía en esta etapa.

CUADRO 2. Porcentaje de semillas germinadas y tiempo de aparición de la primera hoja verdadera en plantas inoculadas y sin inocular en dos suelos contrastantes de Venezuela.

Tratamiento	Germinación de las semillas (%)				Aparición de la primera hoja (%)			
	4 días		5-8 días		6 días		7-10 días	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Sin inóculo	52 b	43 a	66 b	92 b	63 b	50 a	100 a	90 b
Fijador de N	75 a	41 a	96 a	98 a	87 a	52 a	100 a	98 a
Solubilizador de P	49 b	40 a	64 b	94 b	57 b	46 ab	100 a	98 a

A= Suelo de alta fertilidad; B= suelo de baja fertilidad. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa y letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada suelo. Prueba de Medias Duncan, $P \leq 0,005$.

La cepa SF no estimuló la germinación en ninguno de los dos suelos durante los primeros 4. Resultados similares se obtuvo al determinar la precocidad en el suelo con buena fertilidad. El tratamiento con la cepa FN muestra 87% de las plantas con la primera hoja verdadera a los 6 d, frente a 63% del testigo (sin inocular). En el suelo de baja fertilidad no se observa el efecto estimulador sino hasta los 10 d, indicando la necesidad de un tiempo mayor para el desarrollo de las bacterias en este suelo ácido de sabana.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de las mediciones de todas las plantas en los dos suelos (A y B) al momento de la cosecha, a los 45 d. La altura de planta estuvo entre 68 y 108 cm en el suelo A y entre 34 y 49 cm en el suelo de menor fertilidad.

En el suelo A, la altura de planta fue estadísticamente superior en los tratamientos 2 y 3, seguido del tratamiento 5, obteniéndose el menor valor con los tratamientos 4, 6 y 8.

En el suelo B, también se logró la mayor altura de la planta con el tratamiento 3, seguido por los tratamientos 2 y 7. Mientras que los valores de diámetro de tallo oscilaron entre 1,95 y 2,08 cm en el suelo A y entre 0,66

y 0,94 cm en el suelo B, no encontrándose diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en el suelo A y correspondiendo los mayores valores a los tratamientos 3 y 6 en el suelo B.

Con respecto a la variable largo de hoja, los valores promedios oscilaron entre 63 y 83,9 cm en el suelo A y entre 31 y 50,5 en el suelo B. El largo de la hoja fue mayor, estadísticamente, en el tratamiento 3, seguido del tratamiento 2 en el suelo A.

Mientras que el suelo B se alcanzaron los mayores valores en los tratamientos 2, 3, 4, 6 y 7 sin diferencias estadísticas significativas entre estos tratamientos y el menor valor fue con el tratamiento 8. Con relación al ancho de hoja, los valores variaron entre 5,2 y 6,2 cm en el suelo A y entre 2,35 y 3,43 cm en el suelo B.

En el suelo A los valores estadísticamente mayores fueron logrados con los tratamientos 2, 3, 5, 7 y 8; mientras que en el suelo B se alcanzó mayores valores en esta variable con los tratamientos 2, 3 y 6. Estos resultados reflejan distintas respuestas de las cepas para el mismo cultivo dependiendo del nivel de fertilidad inicial del suelo y de la variable a evaluar.

CUADRO 3. Efecto de la aplicación de los inoculantes sobre altura de planta, diámetro del tallo, largo y ancho de hoja del maíz a los 45 días después de la siembra en dos suelos contrastantes.

Tratamiento	Altura de planta (cm)		Diámetro del tallo (cm)		Largo de la hoja (cm)		Ancho de la hoja (cm)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	98,7 b	34,0 c	2,06 a	0,66 d	74,3 b	38,5 b	5,7 ab	2,65 bc
2	108,1 a	46,5 ab	2,03 a	0,90 ab	77,1 ab	47,8 a	6,2 a	3,43 a
3	107,2 a	49,2 a	2,05 a	0,94 a	83,9 a	50,5 a	6,1 a	3,20 a
4	95,1 bc	43,6 b	2,04 a	0,90 ab	72,5 bc	48,1 a	5,8 ab	3,10 ab
5	01,9 ab	36,8 b	2,08 a	0,72 c	75,9 b	37,1 b	6,0 a	2,65 bc
6	68,6 c	43,7 b	1,95 a	0,93 a	63,4 d	47,4 a	5,2 b	3,40 a
7	97,5 b	46,2 ab	2,04 a	0,87 b	69,2 c	48,4 a	6,0 a	2,85 b
8	89,2 c	27,6 d	2,03 a	0,57 d	74,1 b	31,1 a	6,1a	2,35 c
ES	6,35	2,79	0,08	0,04	7,65	6,78	0,50	0,26

A = Suelo con alta fertilidad; B= Suelo con baja fertilidad. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa y letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada suelo. Prueba de Medias Duncan, P = 0,005. ES= error estadístico.

Como puede notarse, se pone de manifiesto la efectividad de la inoculación con las bacterias FN de forma asociativa (tratamiento 3), ya que reduciendo la dosis de N en alrededor de 30% de la dosis normalmente recomendada, se alcanzaron en las variables evaluadas valores significativamente semejantes a los obtenidos con el tratamiento 2, que tiene 100% de la dosis de N en ambos suelos. Estos resultados se ratifican al hacer el análisis del contenido de Nitrógeno de las plantas al terminar el experimento, como se observa en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Contenido de nitrógeno y fósforo en las plantas en los suelos A y B de alta y baja fertilidad, respectivamente.

Tratamiento	N total (%)		P total (%)	
	Suelo A	Suelo B	Suelo A	Suelo B
1	0,68 ab	0,63 ab	0,23 a	0,09 b
2	1,08 a	0,69 ab	0,22 a	0,10 a
3	0,94 a	1,02 a	0,23 a	0,29 a
4	0,93 a	1,11 a	0,23 a	0,11 a
5	0,95 a	0,83 a	0,25 a	0,21 a
6	0,93 a	0,83 a	0,24 a	0,10 a
7	0,97 a	1,04 a	0,23 a	0,10 a
8	0,69 ab	0,84 a	0,23 a	0,29 a

A= Suelo de alta fertilidad; B= suelo de baja fertilidad. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa y letras diferentes que hay diferencias significativas entre tratamientos en cada suelo. Prueba de Medias Duncan, $P < 0,005$.

Puede verse que en los tratamientos 3 y 4, con 70% de N aplicado en forma de urea, el contenido de nitrógeno en las plantas es igual al de los tratamientos 2, 5, 6 y 7, que recibieron 100% de nitrógeno, lo cual puede atribuirse a la actividad fijadora por parte de las bacterias inoculadas.

La Figura 1 permite observar como se manifiesta el efecto de la inoculación de estas bacterias sobre el desarrollo de las plantas.

Puede verse en las Figuras 1-1 y 1-2 que no hay ninguna diferencia en el desarrollo de las plantas en ambos tratamientos, lo que indica que la cepa inoculada fue capaz de suministrar a las plantas el nitrógeno necesario en el caso del suelo con buena fertilidad. En lo que respecta al suelo con baja fertilidad (Figuras 1-3 y 1-4) se observa un mayor desarrollo en las plantas que recibieron 70% de nitrógeno inorgánico recomendado –de acuerdo a los instructivos de fertilización utilizados- y fueron inoculadas.

En este caso la bacteria, además de suministrar el nitrógeno necesario, estimuló el crecimiento por la acción de las sustancias activas que es capaz de sintetizar, lo cual constituye una característica de las bacterias del género *Azotobacter* (Dibut, 2001).

Cuando se aplican las bacterias SF (tratamientos 4, 6 y 7) no se observa efecto en el suelo de alta fertilidad, el cual posee alta disponibilidad de fósforo (23 mg kg^{-1}), pero se nota un beneficio marcado en el suelo B de baja fertilidad, que tiene un contenido de fósforo muy bajo ($2,5 \text{ mg kg}^{-1}$). Así, en el tratamiento 7, que no recibió fertilización inorgánica de fósforo (P-RFR), no obstante, fue inoculada, los resultados son significativamente similares a los del tratamiento 2, que recibió 100% de la dosis de fósforo recomendada, lo cual puede ser atribuido a la acción de las bacterias, que pusieron a disposición de las plantas el elemento necesario a través de su actividad SF fijado en el suelo. Lo mismo ocurrió con el tratamiento 6, al que se aplicó sólo 50% del fósforo en forma de RF, y en el tratamiento 4, que recibió la inoculación conjunta de bacterias FNy SF.

En el Cuadro 5 se presenta la producción de biomasa de las plantas, reflejándose el efecto de los bioproductos para contribuir a un mayor incremento de materia seca, siendo superior en el suelo A de alta fertilidad, lo cual indica el efecto diferencial de las cepas dependiendo el tipo de suelo, comprobándose lo señalado en los párrafos anteriores.

La evaluación del efecto integral que tiene cada tratamiento sobre el desarrollo de las plantas de maíz permite interpretar los resultados en tres grupos de acuerdo a los tratamientos. En un primer grupo, pueden colocarse los tratamientos que permitieron un mayor desarrollo integral de las plantas en ambos suelos, y comprenden los tratamientos 2 y 3, a los cuales se aplicó 100% de fósforo; sin embargo, el tratamiento 2 recibió 100% de nitrógeno y el tratamiento 3 sólo 70%.

A pesar de haberse reducido la dosis de N en 30% con respecto a la recomendada, no hubo diferencias en el desarrollo, lo que demuestra que la cepa FN aplicada tiene un elevado efecto estimulador del crecimiento en las plantas.

La multiplicación de las bacterias FN en el suelo depende en gran medida de la disponibilidad de fósforo y potasio. La deficiencia de estos elementos reduce los niveles de biomasa bacteriana y, en consecuencia, disminuye la fijación de nitrógeno, lo cual comienza cuando la concentración de fósforo en el medio es de 0,004% y se inhibe cuando alcanza 0,8% (Mishustin y Silnikova, 1971).



FIGURA. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno de forma asociativa sobre el desarrollo de las plantas de maíz en los dos suelos contrastantes. 1-1. Reducción del 30% de nitrógeno e inoculación con bacterias fijadoras en suelo de alta fertilidad. 1-2. 100% de nitrógeno en el suelo de alta fertilidad. 1-3. Reducción del 30% de nitrógeno e inoculación con bacterias fijadoras en suelo con baja fertilidad. 1-4. 100% de nitrógeno en el suelo de baja fertilidad.

En el suelo A de alta fertilidad, el contenido de fósforo es de 0,0023%, más bajo que el necesario para lograr fijación biológica de nitrógeno; pero la adición de la RF, tomando en cuenta la fracción que se hace asimilable, permite alcanzar niveles superiores a 0,004% y, en consecuencia, se desarrolla el proceso fijador, que le suministra a la planta el nitrógeno necesario para su buen crecimiento, además de las sustancias activas capaces de estimular el crecimiento.

Según Hammond y León (1983) la RFR de Riecito (RFR) es de alta reactividad, ya que el % de solubilidad de P_2O_5 en citrato de amonio neutro es mayor a 5,9; estos investigadores indican que una eficiencia agronómica (EA) mayor a 90% es un indicador de alta solubilidad de las RF, lo cual aumenta el potencial de estos fertilizantes para ser utilizados como fuentes de P y Ca en cultivos de ciclo corto como el los evaluado.

Por otra parte, Ramírez y López (2000) y López *et al.* (2006) han encontrado alta respuesta en cultivos de ciclo corto (sorgo, quinchoncho y frijol) utilizando la RFR de Riecito en suelos ácidos de baja fertilidad.

En el caso del suelo con baja fertilidad (Suelo B), el contenido de fósforo asimilable en el suelo es sólo

0,00025% y la adición de la RF no eleva su contenido a más de 0,0012%, cantidad, que aun parece ser insuficiente para que haya fijación biológica de nitrógeno (FBN). Es decir, que los buenos resultados que se obtuvieron con el tratamiento 3 en este suelo no se debieron al aumento del suministro de nitrógeno, sino a la síntesis de sustancias activas que estimulan el desarrollo de las plantas, como se pone de manifiesto en el Cuadro 5, en la que se muestra el mayor peso de las raíces se obtuvo con el tratamiento 3, donde fue más del doble que el obtenido con el tratamiento 2, que había recibido todos los nutrimentos. Igualmente, en el Cuadro 3 los valores absolutos más altos en este suelo en altura de la planta, diámetro del tallo y largo de la hoja correspondieron al tratamiento 3.

Es conocido que las bacterias fijadoras de forma asociativa se consideran PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento) porque sintetizan altas cantidades de sustancias activas reguladoras del crecimiento (Martínez-Viera *et al.*, 2007). Según Glick (1995), este efecto actúa directamente sobre el desarrollo de las plantas y el conjunto de sustancias que son asimiladas a través de las raíces permite que cada una de ellas actúe en el momento en que la planta lo requiera.

CUADRO 5. Efecto de la aplicación de los inoculantes sobre la producción de biomasa en maíz cultivado en dos tipos de suelos, de alta y baja fertilidad.

Tratamiento	Peso seco de la parte aérea (g planta ⁻¹)		Peso seco de las raíces (g planta ⁻¹)	
	A	B	A	B
1	27,8	10,4	15,6	1,90
2	28,7	12,8	14,7	2,52
3	26,8	12,4	15,3	5,49
4	26,8	12,7	14,8	4,52
5	27,8	10,8	15,1	2,79
6	22,1	12,2	11,6	4,80
7	26,8	12,5	14,3	4,44
8	25,0	9,7	14,1	1,23

El género de bacterias fijadoras más importante como PGPR es *Azotobacter*, especialmente *A. chroococcum*, (Martínez- Viera, 1986). En cepas tropicales de esta bacteria se ha demostrado su capacidad para sintetizar cantidades elevadas de sustancias activas (Dibut, 2001).

También estas bacterias fijadoras se consideran EPR (rizobacterias promotoras de la emergencia), ya que son capaces, gracias a las sustancias activas, de estimular la emergencia de las plántulas (Requena *et al.*, 1997), como se pone de manifiesto en el Cuadro 2 en ambos tipos de suelos, aunque con una efectividad superior en el caso del suelo con alta fertilidad. Este efecto se atribuye, entre otros factores, al mayor y más rápido desarrollo de las raíces como se mostró anteriormente en el Cuadro 5.

Un segundo grupo de tratamientos está formado por el 4,6 y 7, que tienen cantidades reducidas de fertilizante fosfórico (50 % en T4 y T6) o no se aplicó (tratamiento 7) y que fueron inoculadas con bacterias solubilizadoras. En el suelo de buena fertilidad, que tiene una cantidad satisfactoria de fósforo disponible, el efecto de la inoculación no se pone de manifiesto. Sin embargo, en el suelo con baja fertilidad, las plantas alcanzan un crecimiento aceptable, a pesar del bajo contenido del elemento en el suelo. Estos resultados reflejan la importancia de los microorganismos con potencias para solubilizar fósforo y estimular el crecimiento vegetal, pudiendo ser utilizados como biofertilizantes, después de ser evaluados en condiciones de campo y realizar las pruebas de compatibilidad: cepa-suelo-cultivo, contribuyendo a una producción con

principios agroecológicos. Los resultados mostrados en el Cuadro 5 ratifican lo expresado anteriormente.

La disponibilidad de P permitió cubrir los requerimientos de este elemento, lo cual se traduce en una reducción de las aplicaciones inorgánicas de P, principalmente la de origen industrial, lo cual incide igualmente sobre la reducción en los costos de producción y en los riesgos de contaminación ambiental, más aún, si se considera la aseveración realizada por Casanova (1993), quien señala que en Venezuela, más del 82% de los suelos presentan baja disponibilidad de fósforo, por lo que deben aplicarse cantidades muy altas de fertilizantes, ya que para elevar 1 mg kg⁻¹ el contenido de fósforo en la solución del suelo se requiere la aplicación de este elemento entre 60 a 200 mg kg⁻¹.

El hecho de que en el tratamiento 7 -que no recibió fertilizante fosfórico-, las plantas de maíz hayan alcanzado un desarrollo estadísticamente semejante al del tratamiento 2 -que recibió 100% de la dosis recomendada- indica el papel efectivo que cumplieron las bacterias solubilizadoras en el suelo con baja fertilidad.

Por último, los tratamientos 1 y 8, que no recibieron nitrógeno ni fueron inoculadas, mostraron los menores desarrollos de las plantas.

Como se deduce de la discusión, se ha puesto de manifiesto en los resultados obtenidos la capacidad que tienen las cepas de microorganismos seleccionadas como FN de forma asociativa o SF del suelo para movilizar nutrimentos con un mínimo consumo de recursos, además de la rapidez con que pueden realizarse estos procesos.

CONCLUSIONES

- Las cepas nativas utilizadas presentan potencial para estimular el crecimiento vegetal, FN y SF, por tanto pueden ser seleccionadas para ser utilizadas como biofertilizantes después de haberse evaluado su efectividad en experimentos de campo.
- El efecto de las cepas evaluadas sobre el crecimiento del maíz fue diferente de acuerdo a la disponibilidad de nutrimentos del suelo, siendo más efectivas en el suelo de mayor fertilidad.
- Las cepas SF presentaron mayor potencial en el suelo de menor disponibilidad de este elemento, siendo una alternativa técnica, ecológica y económica viable para contribuir a hacer disponible para las plantas el P-retenido a las plantas.

- La cepa FN de forma asociativa logró un mejor comportamiento y efecto en el suelo de mayor disponibilidad de P, lo cual demuestra la necesidad de definir contenidos mínimos de P en el suelo para contribuir a la FBN en suelos de muy baja fertilidad.

Nota: Las cepas evaluadas fueron aisladas de uno de los tratamientos evaluados en un experimento de campo manejado con principios agroecológicos donde se desarrolló la tesis de doctorado de Marisol López.

BIBLIOGRAFÍA

- Bauer, T. 2001. Microorganismos fijadores de nitrógeno. (<http://www.microbiologia.com/nf/suelo/rhizobium.html>).
- Burdman, S., E. Jarkevicht e Y. Okón. 2000. Recent advances in the use of PGPR in Agriculture. En *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. Science Publishers Inc., Plymouth, UK. 29-250 p.
- Casanova, E. 1993. Las rocas fosfóricas y su uso agroindustrial en Venezuela. Apuntes técnicos de Palmaven, Maracay, Venezuela. 124 p
- Dibut, B. 2001. Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento para el beneficio de la cebolla. Tesis de Doctorado, La Habana. 104 p
- Dibut, B., R. Martínez Viera., Y. Ríos y M. Ortega. 2003. DIMARGON-M, nueva variante nutritiva para la producción de biofertilizantes y bioestimuladores a base de azotobacter. **In:** resúmenes del V encuentro de Agricultura Orgánica. La Habana. 36 p.
- Gilabert de Brito, J, López de Rojas I. y R. Roberti. 1990. Análisis de suelo para diagnóstico de fertilidad. **In:** Manual de métodos y procedimientos de referencia. FONAIAP-CENIAP. Maracay. Cap.4.1-5.1 (Serie. D.N° 26).
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian J. Microbiol.* 41:109-117.
- Hammond, L. L. and L. A. Leon. 1983. Agronomic effectiveness of natural and altered phosphate rocks from Latin America. **In:** IMPHOS, ed. 3rd international congress on phosphorus compounds. Brussels. 503-518 p.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). 2005. Manual de alternativas de recomendaciones de fertilizantes para cultivos prioritarios en Venezuela. López de R., I, N. Alfonzo, N. Gómez, M. Navas y P. Yáñez. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Gerencia de Investigación, Programa de Tecnología Agropecuaria. Maracay, Venezuela. 263 p.
- López, M., I. López de Rojas, M. España, A. Izquierdo y L. Herrera. 2007. Efecto de la fertilización inorgánica sobre la disponibilidad de nutrimentos en el suelo, nivel nutricional de la planta y hongos micorrícicos arbusculares en plantaciones de *Theobroma cacao* L. *Agronomía Trop.* 57(1):31-43.
- López, M. 2007. ¿Es posible incrementar la capacidad productiva de suelos ácidos tropicales utilizando abonos orgánicos?. *Revista digital CENIAP HOY* N° 14 mayo - agosto 2007. Maracay, Aragua Venezuela. ISSN: 1690-4117 Depósito legal: 200302AR1449. Sitio: www.ceniap.gob.ve.
- López, M., N. Alfonzo, A. Florentino y M. Pérez. 2006. Dinámica del Fósforo y Reducción del Aluminio Intercambiable en un Suelo Ultisol Sometido a Manejo Conservacionista en Venezuela; *Interciencia*, 31:293-299.
- Martínez-Viera, R. 1986. Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Ed. Científico Técnica, La Habana, 135 p.
- Martínez-Viera, R., B. Dibut, G. Tejada y R. García. 2001. Trascendencia internacional de los biofertilizantes cubanos. **In:** Memorias del XV Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo, Varadero. Formato electrónico CD.
- Martínez-Viera, R., M. López, M. Brossard F., G. Tejada., H. Pereira, C. Parra, S. Rodríguez y A. Alba. 2006. Procedimientos para el estudio y fabricación de Biofertilizantes Bacterianos. Maracay. Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 88 p. (Serie B. N° 11).
- Martínez-Viera, R., M. López, B. Dibut A., C. Parra Z. y J. Rodríguez S. 2007. La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Publicación especial del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierra. 172 p.
- Mishustin, E. N. y E. K. Silnikova. 1971. Biological fixation of atmospheric nitrogen. Mc. Millan Ed. Londres 675 p.

- Ramírez, R. y M. López. 2000. Agronomy effectiveness of phosphate rock and superphosphate for aluminum tolerant and non-tolerant sorghum cultivars. *Communication Soil Science Analysis* 31(9 y 10):1 169-1 178.
- Requena, N., I. Jimenez, M. Toro and J. M. Barea. 1997. Interactions between plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium spp. *New Phytol.*, 136:667-677.
- Rey, J. C. 2003. Informe de clasificación de suelo de lote experimental, ubicado en Municipio Espino, estado Guárico. 6 p.
- Torres, D., A. Florentino y M. López. 2005. Pérdidas de suelo y nitrógeno por escorrentía en un suelo Ultisol degradado bajo diferentes condiciones de cobertura vegetal en Chaguaramas-Guárico. *Agronomía Trop.* 55(4):475-496.
- Torres, D., A. Florentino y M. López. 2006. Indicadores e índices de calidad de suelo en un Ultisol bajo diferentes prácticas de manejo conservacionista en Guárico, Venezuela. *Bioagro*. Volumen 18(2):83-91.