

Inoculación con *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* en Pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el Departamento de Cesar (Colombia)

Inoculation with *Azospirillum* spp and *Enterobacter agglomerans* in Guinea Grass (*Panicum maximum* Jacq.) in the Cesar Department (Colombia)

Diana María Cárdenas Caro¹; María Fernanda Garrido Rubiano²;
Belisario Antonio Roncallo Fandiño³ y Ruth Rebeca Bonilla Buitrago⁴

Resumen. Se evaluó el efecto de los aislados SRGM2, SRGM3 y SRGM4 de *Azospirillum* spp. en el crecimiento y desarrollo de plantas de pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq cv. Tanzania) en la Estación Experimental Motilonia de Corpoica, del municipio Agustín Codazzi (Cesar, Colombia). Se realizó inoculación por imbibición de las semillas, y en el momento de la siembra, en las macetas en condiciones de casa malla. Se utilizó inoculación simple de los aislados de *Azospirillum* sp y co-inoculación con una cepa fosfato solubilizadora de *Enterobacter agglomerans* (UV1), aislada de suelos cultivados con algodón en el departamento de Cesar. Las variables estudiadas en las plantas fueron: germinación, peso foliar fresco y seco, peso radical fresco y seco, fósforo y proteína foliar. Los resultados mostraron que la inoculación simple y combinada promovió la germinación de semillas del pasto guinea ($P \leq 0,05$) con respecto al tratamiento sin inoculación (testigo absoluto); y aunque no se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en las demás variables estudiadas, se encontraron aumentos de hasta 26,80% en proteína cruda, y 45,67% en materia seca foliar comparada con las plantas tratadas con 100% de fertilización nitrogenada. Se observó que el aislado de *Azospirillum* SRGM2 co-inoculado con *Enterobacter agglomerans* UV1 registró los mayores valores en el crecimiento vegetal del pasto guinea, por lo que se consideró como una rizobacteria promisorio para la biofertilización de esta gramínea utilizada en la alimentación bovina en la costa caribe colombiana.

Palabras clave: Fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, biofertilización

Abstract. The effect of the isolates SRGM2, SRGM3 and SRGM4 of *Azospirillum* spp. on the growth and development of Guinea grass plants (*Panicum maximum* Jacq cv. Tanzania) was evaluated in the Experimental Station Motilonia of Corpoica, municipality Agustín Codazzi (Cesar, Colombia). The inoculation was performed by imbibition of seeds and at planting time in pots under greenhouse conditions. It was used simple inoculation of isolates of *Azospirillum* sp. and co-inoculation with a phosphate solubilizing strain of *Enterobacter agglomerans* (UV1), isolated from cotton soils of the department of Cesar. The studied variables were plant germination, fresh and dry leaf weight, fresh and dry root weight, phosphorus and protein contents. The results showed that single and combined inoculation promoted the germination of seeds of Guinea grass ($P \leq 0.05$) compared to treatment without inoculation (absolute control); and although there were no significant differences ($P \leq 0.05$) in the other studied variables, it was found increases of up to 26.80% in crude protein and 45.67% in leaf dry matter compared with plants treated with 100% of nitrogen. It was observed that the isolate SRGM2 of *Azospirillum* co-inoculated with *Enterobacter agglomerans* UV1 recorded the highest values in plant growth of Guinea grass, so it was considered as a promising rhizobacteria for biofertilization of this grass used to feed cattle in the colombian caribbean coast.

Key words: Biological nitrogen fixation, phosphates solubilization, biofertilization.

El Cesar es uno de los departamentos ganaderos de la costa caribe colombiana y en el cual está localizado el municipio de Codazzi, que es una importante área productora de leche (Gamarra, 2005). En esta región, el suelo es uno de los factores más influyentes en el rendimiento de la producción ganadera (Viloria, 2003). Las especies vegetales más difundidas en la ganadería costeña son angleton (*Dichantium aristatum*), estrella (*Cynodon plectostachyus*), guinea (*Panicum maximum*), colosuana (*Bothriochoa pertusa*) y braquiaria (*Brachiaria decumbens*), siendo el pasto

guinea el más productivo (Cuesta, 2005). En general, las especies vegetales tropicales son de mediana a baja calidad, dependiendo del manejo empleado (Laredo y Ardila, 1984). De esta forma, un manejo inadecuado se refleja en las limitaciones nutricionales de estas gramíneas, principalmente por su alto contenido de fibra, bajo aporte de proteína, desbalance de minerales y digestibilidad baja (Roncallo et al., 1998).

Esta situación ha sido atribuida a la pérdida de fertilidad de los suelos, particularmente a la baja disponibilidad

¹ Profesora Auxiliar. Universidad Francisco de Paula Santander - Facultad de Ciencias Básicas - Departamento de Biología. Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas Majumba. Av. Gran Colombia No. 12E-96 Colsag. Cúcuta, Colombia. <diana.cardenascaros@hotmail.com>

² Investigadora Master. CORPOICA - Laboratorio de Microbiología de Suelos CBB, C.I. Tibaitatá, km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. <mgarrido@corpoica.org.co>

³ Investigador Principal. CORPOICA - E.E. Motilonia, km 05 vía a Bucaramanga, Apdo. Postal 021, Agustín Codazzi, Cesar, Colombia. <broncallo@corpoica.org.co>

⁴ Investigador Ph.D. Principal. CORPOICA - Laboratorio de Microbiología de Suelos CBB, C. I. Tibaitatá, km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. <rbonilla@corpoica.org.co>

Recibido: Octubre 23 de 2012; Aceptado: Noviembre 04 de 2013.

doi: <http://dx.doi.org/10.15446/rfnam.v67n2.44168>



de nitrógeno (N). Para suplir la deficiencia de este nutriente se utiliza la fertilización nitrogenada de síntesis, la cual no es viable por los altos costos ambientales y económicos (Garrido *et al.*, 2010). Por esta razón, la actividad microbiana de fijación de nitrógeno atmosférico (N₂) es una alternativa para proveer el elemento a las plantas que permite disminuir la utilización de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento del cultivo, acortar ciclos y reducir la contaminación ambiental (Lara *et al.*, 2011). Sin embargo, esta molécula diatómica únicamente puede ser reducida y fijada hasta iones amonio y nitrato por bacterias, cianobacterias y actinomicetos, los cuales pueden fijar el nitrógeno viviendo libremente en el suelo o formando asociaciones con las raíces de las plantas (Mayz-Figueroa, 2004).

Entre las bacterias que han presentado mejor respuesta en la asociación con las raíces de gramíneas, se encuentra el género *Azospirillum*, favoreciendo el crecimiento y rendimiento del cultivo de sorgo (García *et al.*, 2006), trigo (Naiman *et al.*, 2009), arroz (Ruíz *et al.*, 2011) y especialmente de gramíneas forrajeras como los pastos *B. decumbens*, *B. brizantha* (Reis-Junior *et al.*, 2004), *Axonopus purpusii*, *Elyonurus muticus* y *B. humidicola* (Brasil *et al.*, 2005). *Azospirillum* es una bacteria aeróbica de vida libre que fija nitrógeno bajo condiciones microaerófilas y es considerada una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal puesto que ejerce diferentes mecanismos de estímulo del crecimiento de las plantas; además de la fijación de nitrógeno, también intervienen en la producción de fitohormonas, principalmente ácido indolacético y giberelinas, lo cual modifica el metabolismo y morfología de los vegetales y conduce a una mejor captación de agua y minerales (Flores *et al.*, 2010).

Aunque diversas investigaciones han demostrado actividad promotora del crecimiento vegetal de la bacteria *A. brasilense* en inoculaciones simples, recientemente los estudios han sido dirigidos a la co-inoculación con otros microorganismos como fosfatodisolubilizadores y hongos formadores de micorrizas (HFM). Esta co-inoculación consiste en una combinación de microorganismos que interactúan sinérgicamente para mejorar el desarrollo de las plantas y así mismo, ayudar a la supervivencia de la población microbiana en los suelos donde se inoculan (Joe *et al.*, 2009). Han sido propuestos diferentes mecanismos por los cuales la co-inoculación microbiana, particularmente de *Azospirillum*, favorece el crecimiento vegetal. Ruíz *et al.* (2011) reportaron un beneficio en la

micorrización de raíces de plantas de arroz inoculadas con un aislado de *Azospirillum brasilense*, debido a un cambio en la morfología y volumen del sistema radical, lo cual puede contribuir al incremento de sitios de micorrización como resultado de la producción de fitohormonas, movilización de nutrientes de la fracción mineral y orgánica del suelo por parte de esta bacteria. Además, se ha encontrado que la co-inoculación con bacterias fosfatodisolubilizadoras como *Pantoea dispersa* puede mejorar el balance de nutrientes que proveen o movilizan estos microorganismos a las plantas y por lo tanto mejora crecimiento y productividad (Flores *et al.*, 2010). Así, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de inoculación de aislados nativos de *Azospirillum* spp y de la bacteria fosfatodisolubilizadora, *Enterobacter agglomerans* (UV1) en la promoción del crecimiento vegetal del pasto guinea en el valle del Cesar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Se utilizaron cepas de *Azospirillum* spp. aisladas del pasto guinea existente en la Estación Experimental Motilonia (Codazzi, Cesar), aislado *Azospirillum* sp. SRGM2, *Azospirillum* sp. SRGM3 y *Azospirillum* sp. SRGM4 (Cárdenas *et al.*, 2010), y dos cepas brasileñas de referencia correspondientes a *Azospirillum brasilense* (Sp7) y *A. amazonense* (Y2). La co-inoculación se realizó con una cepa de *Enterobacter agglomerans* (UV1), aislada de suelos algodóneros del valle del Cesar y seleccionada por su alta capacidad fosfatodisolvente (Caballero *et al.*, 2007). Los aislados SRGM2, SRGM3, SRGM4 y UV1 pertenecen a la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) del C.I. CORPOICA, Tibaitatá (Colombia).

Producción de inoculantes. Los aislados de *Azospirillum* spp se cultivaron en placas con agar Rojo Congo (Rodríguez, 1982) y se obtuvieron suspensiones celulares en solución salina (0,85% de NaCl) a partir de estos cultivos. Se inocularon 4 mL de esta suspensión celular en 200 mL de caldo DYGS (Radwan *et al.*, 2004) y se incubaron durante 48 h en agitación a 120 rpm y 32 °C. El aislado de *E. agglomerans* (UV1) se cultivó en placas de agar SRSM (Caballero *et al.*, 2007) y se inocularon 4 mL de esta suspensión celular en 200 mL de caldo SRSM sin el indicador púrpura de bromocresol. Una vez obtenidos los inoculantes se ajustó su concentración celular a una densidad óptica D.O._{600nm} = 0,5 que correspondió a un recuento en placa de 1-8·10⁷ UFC mL⁻¹ en agar Rojo Congo (*Azospirillum* spp) y SRSM (*E. agglomerans* UV1).

Inoculación y siembra de las semillas. Se llenaron macetas con capacidad de 2 kg, con suelo colectado en la Estación Experimental Motilonia (Codazzi, Cesar) el cual presentó textura franco arcillosa, 2% de materia orgánica, pH 6,8 y 115 ppm de P₂O₅. Se colocaron semillas del pasto guinea de igual tamaño en placas Petri, donde se adicionaron 30 mL de inoculante según el tratamiento correspondiente. Para los tratamientos testigo absoluto y testigo químico, se adicionaron 30 mL de agua destilada estéril. Para los tratamientos con la co-inoculación se obtuvo una mezcla adicionando 15 mL de la cepa de *Azospirillum* correspondiente a cada uno de los tratamientos y 15 mL de la cepa de *E. agglomerans*. Las semillas inoculadas se mantuvieron en estas condiciones durante 4 h en cabina estéril. En

cinco sitios de las macetas se sembraron tres semillas por sitio y se aplicó en cada uno 0,2 mL del inóculo correspondiente. Se estableció un diseño experimental completamente al azar con 12 tratamientos y tres macetas para cada uno (Tabla 1). Posterior a 10 días de siembra se registró el porcentaje de germinación y se dejaron cinco plantas por maceta para un total de 15 unidades experimentales por tratamiento y 118 en los 12 tratamientos. Se realizó fertilización química en el testigo químico, y para los demás tratamientos se aplicó el 50% de la fertilización nitrogenada. El experimento se mantuvo los 45 días siguientes, tiempo en el que se midió el peso fresco y seco de hojas y raíces, porcentaje de proteína bruta y fósforo total en el tejido foliar.

Tabla 1. Tratamientos establecidos para determinar el efecto de la inoculación de las cepas de *Azospirillum* spp sobre el crecimiento del pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el valle del Cesar, Colombia.

Tratamiento	Descripción
Testigo absoluto	30 mL de agua estéril + 0,2 mL de agua estéril /sitio Sin fertilización química Sin inoculantes biológicos
Testigo químico	Fertilización química nitrogenada (100%) * Sin inoculantes biológicos
<i>A. brasilense</i>	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>A. brasilense</i> cepa Sp7
<i>A. amazonense</i>	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>A. amazonense</i> cepa Y2
SRGM2	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>Azospirillum</i> sp. cepa SRGM2
SRGM3	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>Azospirillum</i> sp. cepa SRGM3
SRGM4	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>Azospirillum</i> sp. cepa SRGM4
<i>A. brasilense</i> + UV1	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>A. brasilense</i> Sp7+ UV1**
<i>A. amazonense</i> + UV1	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>A. amazonense</i> Y2+ UV1
SRGM2 + UV1	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>Azospirillum</i> sp. SRGM2 + UV1
SRGM3 + UV1	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>Azospirillum</i> sp. SRGM3 + UV1
SRGM4 + UV1	Fertilización química nitrogenada (50%) Inoculación con <i>Azospirillum</i> sp. SRGM4 + UV1

* 75 kg ha⁻¹ de N; fuente nitrogenada: Úrea. ** *Enterobacter agglomerans* UV1

Análisis estadístico. Se determinaron los supuestos en los residuales del modelo, normalidad, homogeneidad de varianzas y aleatoriedad. Una vez se comprobaron estos supuestos, se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por el Test de Tukey al nivel de significancia del 5% utilizando el programa estadístico IBM SPSS STATISTICS 19.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación. Los resultados indicaron que la co-inoculación de las rizobacterias promovió la germinación de semillas de pasto guinea,

acortando el período de emergencia de las plantas. En la Figura 1 se observa que en el día 5 todos los tratamientos co-inoculados presentaron entre el 20 y 60% de germinación, y los testigos absoluto y químico alcanzaron el 6 y 17%, respectivamente. Al final de los 10 días de evaluación, el mayor porcentaje de germinación (64,44%) se registró en el tratamiento inoculado con el aislado SRGM3, similar a los tratamientos co-inoculados con SRGM4 + UV1 y SRGM3 + UV1 donde se encontraron valores de 62,22 y 61,11%, respectivamente; y fueron superiores a los porcentaje de germinación en los testigos absoluto (17,78%) y químico (23,33%).

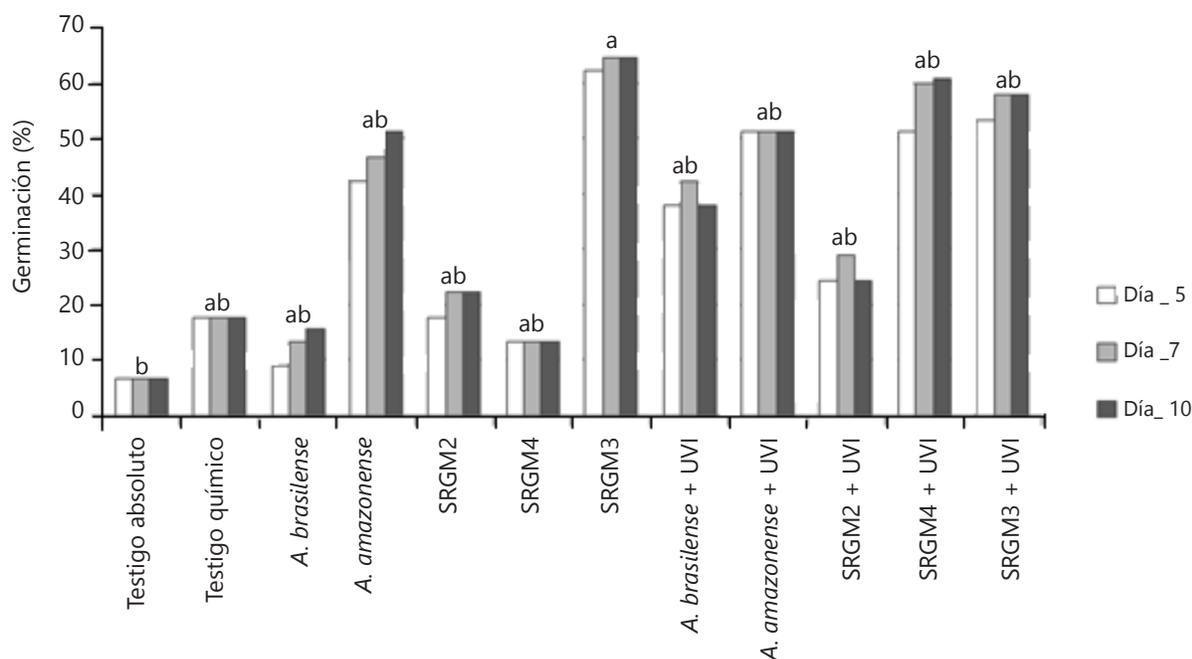


Figura 1. Germinación de semillas de pasto guinea (*Megathyrsus maximus*) inoculadas con rizobacterias (*Azospirillum* sp y *Enterobacter agglomerans*). Columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $P \leq 0,05$)

Efectos positivos sobre la germinación de semillas también fueron reportados por Canto *et al.* (2004) en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin) inoculado con *Azospirillum* sp; y por Cassán *et al.* (2009) en semillas de maíz y soya inoculadas con *A. brasilense* Az39 y *Bradyrhizobium japonicum* E109. Esto puede atribuirse a la producción de fitohormonas, como el ácido indolacético, por *Azospirillum*, que al penetrar los tejidos de las semillas induce un rápido desarrollo del embrión y acelera el crecimiento de la raíz (Zambrano y Díaz, 2009; Cassán *et al.*, 2009). Asimismo, estas bacterias inducen la producción de enzimas como alcohol deshidrogenasa, fosfatasa ácida, glutamina sintetasa, isocitrato

dehidrogenasa, malato deshidrogenasa, piruvato kinasa y shikimato deshidrogenasa, que incrementan la tasa de respiración de las raíces emergidas (Dobbelaere *et al.*, 2001); y en este ambiente benéfico se estimula la proliferación de vellosidades de la raíz y por lo tanto el rápido desarrollo de la plántula por la absorción de agua y nutrientes (Esqueda *et al.*, 2002).

Peso fresco y seco foliar. No se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 2). Sin embargo, el valor más alto (13,33 g) se registró en el tratamiento co-inoculado con las cepas SRGM2 + UV1, siendo similar a los tratamientos co-inoculados con cada

una de las cepas de *Azospirillum* (de referencia y nativas) + UV1, en donde se encontraron valores de 7,55 a 9,28 g de peso fresco foliar. El tratamiento co-inoculado con las cepas SRGM2 + UV1 aumentó 61,07% su peso fresco foliar con respecto al testigo absoluto, similar a lo que se encontró sobre el testigo químico con 65,42%. Todos

los tratamientos co-inoculados presentaron mayores valores de peso seco foliar, en especial, cuando se inoculó con los aislados SRGM3 + UV1 y SRGM2 + UV1 con 1,62 y 1,56 g, respectivamente, con un aumento de 45,67 y 43,58% sobre el testigo químico, aunque estos incrementos no fueron significativos.

Tabla 2. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* sobre las diferentes variables evaluadas en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq c.v. Tanzania).

Tratamiento	Peso fresco foliar (g/planta)	Peso fresco radical (g/planta)	Peso seco foliar (g/planta)	Peso seco radical (g/planta)	Fósforo (mg kg ⁻¹)	Proteína Bruta (%)
Testigo Absoluto	5,19 bc	0,27 a	0,82 ab	0,16 a	0,26 ab	15,94 a
Testigo Químico	4,61 bc	0,44 a	0,88 ab	0,23 a	0,25 b	17,01 a
<i>A. brasilense</i> cepa Sp7	6,86 abc	0,29 a	1,0 ab	0,24 a	0,28 ab	17,2 a
<i>A. amazonense</i> cepa Y2	7,95 bc	0,31 a	1,31 a	0,19 a	0,27 ab	17,50 a
<i>Azospirillum</i> sp. SRGM2	6,52 abc	0,28 a	1,03 ab	0,08 a	0,32 ab	18,28 a
<i>Azospirillum</i> sp. SRGM3	6,07 abc	0,36 a	1,15 ab	0,14 a	0,27 ab	16,85 a
<i>Azospirillum</i> sp. SRGM4	1,50 c	0,24 a	0,37 b	0,04 a	0,22 b	13,32 a
<i>A. brasilense</i> + UV1	8,00 ab	0,59 a	1,27 ab	0,34 a	0,30 ab	21,78 a
<i>A. amazonense</i> + UV1	7,55 ab	0,32 a	1,33 a	0,14 a	0,30 ab	13,42 a
SRGM2+ UV1	13,33 a	0,69 a	1,56 a	0,29 a	0,46 a	23,24 a
SRGM3+ UV1	9,28 ab	0,45 a	1,62 a	0,19 a	0,27 ab	18,66 a
SRGM4+ UV1	8,36 ab	0,57 a	1,20 ab	0,31 a	0,32 ab	18,57 a

⁽¹⁾ Medias seguidas con la misma letra en cada columna no presentaron diferencias significativas entre ellas por el Test de Tukey ($P \leq 0,05$)

Resultados similares fueron obtenidos por Naiman *et al.* (2009) cuando inocularon *A. brasilense* en plantas de trigo y registraron un aumento en la biomasa aérea con respecto al control no inoculado, aunque no fue significativo. Asimismo, García *et al.* (2007) encontraron un aumento no significativo en el peso fresco foliar de plantas de maíz inoculadas con *A. brasilense*. Sin embargo, en otras investigaciones en gramíneas como el maíz, se encontró un incremento significativo en el peso fresco foliar con la inoculación simple y combinada de *A. brasilense* y *Bradyrhizobium japonicum* (Cassán *et al.*, 2009); y en arroz con la co-inoculación de *Azospirillum* + Micorrizas arbusculares (Ruíz *et al.*, 2011).

Este efecto no significativo en la producción de biomasa aérea de las plantas de pasto guinea ha sido atribuido a diversos factores como la presencia de otros microorganismos rizosféricos en el suelo y la capacidad de las bacterias inoculadas para establecerse y competir con la microbiota nativa, así como a condiciones físico-químicas del suelo que pueden resultar no favorables para el crecimiento microbiano (García *et al.*, 2007; González *et al.*, 2011; Bécquer *et al.*, 2012).

Peso fresco y seco radical. Con respecto al peso fresco radical no se obtuvieron diferencias significativas, pero los valores más altos se registraron en los tratamientos co-inoculados con SRGM2 + UV1, Sp7 (*A. brasilense*) + UV1 y SRGM4 + UV1. En los resultados de peso seco radical se encontraron valores similares al comportamiento del peso fresco radical, con los mayores valores en los tratamientos coinoculados con Sp7 (*A. brasilense*) + UV1, SRGM4 + UV1 y SRGM2 + UV1 con 0,34 a 0,29 g de materia seca radical (Tabla 2). Naiman *et al.* (2009) tampoco observaron incrementos significativos en la biomasa radical de plantas de trigo inoculadas con *A. brasilense* o *Pseudomonas fluorescens*, lo cual fue atribuido a la competencia con los microorganismos nativos, especialmente con los endofíticos que habitualmente se encuentran colonizando las raíces de las gramíneas. Por su parte, Canto *et al.* (2004) registraron aumentos significativos sobre la formación de raíces secundarias y terciarias de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin), así como en la materia seca radical, registrando valores entre 0,009 a 0,080 g/planta. Asimismo, Cassán *et al.*, (2009) observaron diferencias significativas con respecto al control, en el peso seco

radical de plantas de maíz con valores inferiores a 0,2 g/plantas, y de soya de hasta 0,58 g/planta, inoculadas con *A. brasilense* y *B. japonicum* simples o combinadas. Sin embargo, los resultados obtenidos en las plantas de pasto guinea fueron superiores con respecto a las gramíneas ya mencionadas, con valores entre 0,04 a 0,34 g/planta.

Absorción de fósforo y nitrógeno. La absorción de fósforo y nitrógeno, mostró una correlación de Pearson altamente significativa al nivel de 0,01 con respecto al peso fresco foliar, y significativa al nivel de 0,05 en relación al peso fresco radical; es decir, que cuanto más fósforo y nitrógeno foliar fue tomado por las raíces de la planta, mejor fue el desarrollo de su sistema foliar y radical. Sin embargo, cuando se analizó el efecto de la inoculación simple o combinada de las rizobacterias, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos co-inoculados o no y los testigos, aunque el contenido de fósforo registró el mayor valor cuando las plantas se co-inoculaban con el aislamiento SRGM2 + UV1 (Tabla 2).

El suelo utilizado en este estudio presentó un valor de fósforo disponible (P_2O_5) de $115 \mu\text{g mL}^{-1}$ el cual es moderadamente alto y esto podría explicar la disponibilidad del elemento y su absorción por las raíces de las plantas de todos los tratamientos evaluados con o sin inoculación de las rizobacterias. Al respecto, Cañón *et al.*, (2009) indicaron que en suelos arroceros con mayor disponibilidad de fósforo, disminuyó la población de microorganismos fosfatolubilizadores puesto que esta actividad biológica se ve afectada debido a que se encuentran fosfatos disponibles para los microorganismos y para las plantas. Probablemente, la alta concentración de fósforo soluble limitó la actividad de las rizobacterias inoculadas y por esto el contenido de fósforo en el tejido foliar no presentó diferencias significativas.

Con respecto al porcentaje de proteína cruda en el tejido foliar, no se obtuvieron diferencias significativas; sin embargo, los mayores valores se observaron en los tratamientos co-inoculados con SRGM2 + UV1 (23,24%) y Sp7 + UV1 (21,78%) lo cual corresponde a un aumento de 26,80 y 21,90% con respecto al testigo con 100% de fertilización química nitrogenada (Tabla 2).

Resultados similares registraron Rodríguez *et al.* (2005), quienes apreciaron que un solo aislado de *Azospirillum* de los 20 que evaluaron en plantas de

trigo, mostró diferencias significativas en la cantidad de nitrógeno foliar con respecto al testigo sin inocular. Por el contrario, estudios en plantas de tomate (Terry *et al.*, 2005), maíz y pimentón (Reyes *et al.*, 2008) mostraron un aumento significativo en el porcentaje de nitrógeno foliar en los tratamientos inoculados con respecto a los tratamientos no inoculados o con fertilización química.

Los resultados obtenidos en esta investigación indicaron una tendencia al mejoramiento del crecimiento de las plantas de pasto guinea con la co-inoculación de *Azospirillum* spp y *E. agglomerans*. Otras investigaciones también han reportado beneficios en el crecimiento y productividad de los cultivos con la co-inoculación de microorganismos como *A. brasilense* Az39 y *Bradyrhizobium japonicum* E109 en maíz y soya (Cassán *et al.*, 2009), *Glomus intraradices* y *A. brasilense* en arroz (Ruíz *et al.*, 2011), *A. brasilense* Cd y *Rhizobium tropici* CIAT899 (Dardanelli *et al.*, 2008). La interacción de las actividades biológicas de estos microorganismos favorecen el ambiente rizosférico optimizando los fertilizantes químicos aplicados a través de la movilización de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno, la fijación biológica del nitrógeno atmosférico y la liberación de fitohormonas (Bashan *et al.*, 2004; Saikia *et al.*, 2012) que estimulan el desarrollo de las raíces de las plantas y éstas a su vez aumentan la actividad microbiana por la liberación de exudados radicales producto del mejoramiento de su actividad fisiológica (Cañón *et al.*, 2009). Por esta razón, cuando se redujo la fertilización nitrogenada al 50% y se sustituyó con los inoculación bacteriana simple y combinada, la respuesta en la biomasa foliar y su porcentaje de proteína cruda fue similar a la producción que se obtuvo con la fertilización nitrogenada al 100% (testigo químico), mostrando un incremento de hasta 26,80% en el contenido de proteína foliar con respecto a este tratamiento, con lo cual se mejoran las características nutricionales de esta gramínea utilizada en la alimentación bovina, con la sustitución parcial de fertilizantes nitrogenados. De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2005), incrementos moderados alrededor de un 20%, aunque no presenten diferencias estadísticas significativas, son considerados comercialmente importantes en la agricultura moderna y en términos económicos y ecológicos estos resultados son promisorios ya que podría aumentar la relación costo/beneficio del cultivo por la disminución de la aplicación de fertilizantes químicos y la promoción de la conservación de los suelos (García *et al.*, 2007; Naiman *et al.*, 2009).

Estos efectos en la promoción del crecimiento y producción de biomasa en las plantas de pasto guinea, pueden ser atribuidos a la actividad biológica desarrollada por las cepas inoculadas. En este sentido, la cepa de la rizobacteria *E. agglomerans* UV1 ha sido reportada con una alta actividad fosfatodisolvente debida a su producción de ácidos orgánicos (Caballero *et al.*, 2007), por lo cual es probable que estas biomoléculas, además, hayan sido utilizadas por *Azospirillum* spp como fuente de carbono para la producción del ATP requerido en el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Saikia *et al.*, 2012), el cual ha sido el primer mecanismo sugerido para promover el crecimiento de las plantas por *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 2004). Aunque, en estudios realizados en las últimas tres décadas, se ha observado que esta bacteria no supe totalmente los requerimientos de nitrógeno por la planta y que la combinación con fertilización química es requerida para alcanzar óptimos resultados en el rendimiento de los cultivos, puesto que la fijación biológica aporta entre 5 y 18% del total del incremento en la planta como se observó en los resultados de esta investigación; y por tanto, estos efectos en el crecimiento son atribuidos a otros mecanismos como la producción de fitohormonas y desplazamiento de patógenos (Bashan *et al.*, 2004; Saikia *et al.*, 2012). Estos resultados también dependen de la interacción bacteria-cultivar (Saikia *et al.*, 2012) lo cual ha sido asociado al reconocimiento de uno o más factores bacterianos determinantes por los receptores específicos de la planta, en consecuencia la respuesta fisiológica de la planta por la inoculación microbiana varía entre las especies vegetales ya que es dependiente del genotipo vegetal y del microorganismo (Bécquer *et al.*, 2012).

Los aislados de *Azospirillum* spp. utilizados también fueron seleccionados por su alta producción de fitohormonas tipo auxinas, determinadas como compuestos indólicos promotores del crecimiento vegetal (Cárdenas *et al.*, 2010). Entre este grupo de compuestos indólicos se han registrado el ácido indolacético, ácido indolbutírico, indol etanol e indol metanol, producidos por la vía metabólica dependiente del triptófano (Saikia *et al.*, 2012) aunque también se ha demostrado la producción de ácido antranílico por *A. brasilense* (Hernández *et al.*, 2008), el cual participa en el mejoramiento del crecimiento y producción de biomasa (Hernández *et al.*, 2010). Otras fitohormonas reconocidas en el género *Azospirillum* son las giberelinas, ácido abscísico y citoquininas (Saikia *et al.*, 2012). Esta actividad biológica de producción de fitohormonas del crecimiento vegetal por los aislados

de *Azospirillum* spp., favorecieron el desarrollo de las raíces del pasto guinea, y por tanto la absorción de fósforo, nitrógeno y otros micronutrientes que mejoran el desarrollo vegetal (Tripathi *et al.*, 2013).

Otros aspectos benéficos de la inoculación de estas rizobacterias tienen que ver con el mejoramiento de la calidad del suelo, ya que promueven la actividad rizosférica, lo que permite la liberación de nutrientes a través de la descomposición de la materia orgánica (Felici *et al.*, 2008), la solubilización de fósforo por la producción de ácidos orgánicos y fosfatasas (Naiman *et al.*, 2009), así como la protección contra fitopatógenos (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006). Por esta razón, la utilización de inoculantes a base de estas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal es una alternativa para el mejoramiento a mediano y largo plazo de las características de los suelos ganaderos donde se cultiva esta gramínea, puesto que se obtiene el mismo rendimiento con la disminución al 50% de fertilización nitrogenada, lo cual se refleja en un menor impacto ambiental y reducción en los costos por la aplicación de estos fertilizantes químicos (García *et al.*, 2007; Naiman *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

Los efectos de las rizobacterias inoculadas sobre las plantas de pasto guinea no mostraron efectos benéficos significativos en las variables estudiadas, excepto en el porcentaje de germinación. Sin embargo, se observó que al reducir el 50% de la fertilización química el comportamiento de las plantas es similar estadísticamente, pero con una tendencia al mejoramiento en la producción de materia seca y proteína cruda foliar, las cuales son características relevantes en la alimentación bovina.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Vera Lúcia Baldani por su valiosa asesoría en el desarrollo del proyecto. A la E.E. Motilonia quien hizo posible con su financiación la realización del proyecto y al equipo humano del Laboratorio de Microbiología de Suelos de C.I. Corpoica Tibaitatá.

BIBLIOGRAFÍA

Bashan, Y., G. Holguín and L.E. de Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). Canadian Journal of Microbiology 50(8): 521–577.

- Bécquer, C.J., G. Lazarovits, L. Nielsen, M. Quintan, M. Adesina, L. Quigley, I. Lalin y C. Ibbotson. 2012. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase II: invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(5): 985-997.
- Brasil, M., J.E. Baldani e V. Baldani. 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas asociadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29(2): 179-190.
- Caballero, T., M. Camelo, R. Bonilla y M. Martínez. 2007. Determinación de actividad fosfato solubilizadora por bacterias aisladas a partir de suelos algodoneros en los departamentos del Cesar y Meta. *Suelos Ecuatoriales* 37(1): 94-100.
- Canto, M.C., S. Medina y D. Morales. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 4(1): 21-27
- Cañón, R.F., V.P. Prato, M.A. Alterio y D.M. Cárdenas. 2009. Efecto del uso del suelo sobre rizobacterias fosfatosolubilizadoras y diazotróficas en el distrito de riego del río Zulia Norte de Santander (Colombia). *Respuestas* 14(2): 14-21.
- Carcaño, M.G., R. Ferrera, J. Pérez, J.D. Molina y Y. Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 24(4): 493-502.
- Cárdenas, D.M., M.F. Garrido, R.R. Bonilla y V.L. Baldani. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes* 33(3): 285-300.
- Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna and V. Luna. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45: 28-35.
- Cuesta, P.A. 2005. Estrategias de manejo de praderas para mejorar la productividad de la ganadería en las regiones Caribe y Valles Interandinos. En: Manual Técnico "Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las regiones caribe y valles interandinos", <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Foros/CAPITULOCUATRO.pdf>. 24 p.; consulta: noviembre 2010.
- Dardanelli, M.S., F.J. Fernández, M.R. Espuny, M.A. Rodríguez, M.E. Soria, A.M. Gil, Y. Okon and M. Megías. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2713-2721.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera, J. Caballero, J.F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig and Y. Okon. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28(9): 871-879.
- Esqueda, M.H., R.L. Carrillo, M. Sosa, A. Melgoza, M.H. Royo y J. Jiménez. 2002. Emergencia y sobrevivencia de gramíneas inoculadas con biofertilizantes en condiciones de invernadero. *Técnica Pecuaria en México* 43(3): 459-475.
- Felici, C., L. Vettori, E. Giraldi, L.M. Costantina, A. Toffanin, A.M. Tagliasacchi and M. Nuti. 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology* 40(2): 260-270.
- Flores, P., J. Fenoll, P. Hellin and P. Aparicio. 2010. Isotopic evidence of significant assimilation of atmospheric-derived nitrogen fixed by *Azospirillum brasilense* co-inoculated with phosphate-solubilising *Pantoea dispersa* in pepper seedling. *Applied Soil Ecology* 46(3): 335-340.
- Gamarra, J.R. 2005. La economía del Cesar después del algodón. En: Documentos de trabajo sobre economía regional No. 59. En: Banco de la República. <http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/DTSER-59.pdf>. 116 p.; consulta: julio 2007.
- García, J.G., V.R. Moreno, I.C. Rodríguez, A. Mendoza y N. Mayek. 2006. Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el Norte de México. *Agricultura Técnica en México* 32(2): 135-141.
- García, J.G., V.R. Moreno, I.C. Rodríguez, A. Mendoza y N. Mayek. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum*

- brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. Revista Fitotecnia Mexicana 30(3): 305-310.
- Garrido, M.F., D.M. Cárdenas, R.R. Bonilla y V.L. Baldani. 2010. Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas. Pastos y Forrajes 33(4): 403-412.
- González, A., D.J. Pérez, O. Franco, A. Balbuena, F. Gutiérrez y H. Romero. 2011. Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. Ciencia Ergo Sum 18(1): 51-58.
- Hernández, J.L., J.D. Quiroz, R. Moreno y N. Mayek. 2008. Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptofano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. Avances en Investigación Agropecuaria 12(1): 57-67.
- Hernández, J.L., V.R. Moreno, J.D. Quiroz, J.G. García y N. Mayek. 2010. Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz. Revista Colombiana de Biotecnología 12(1): 57-63.
- Joe, M.M., Ch.A. Jaleel, P.K. Sivakumar, X.C. Zhao and B. Karthikeyan. 2009. Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 40: 491-499.
- Lara, C., L. Oviedo y A. Alemán. 2011. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar la agricultura. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 9(1): 17-23.
- Laredo, M.A. y A. Ardila. 1984. Variación nutricional en pasto Guinea y Angleton de la zona ganadera del Cesar (Colombia). Revista ICA 19(1): 131-140.
- Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. Revista UDO Agrícola 4(1): 1-20.
- Naiman, A.D., A. Latrónico and I. García. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impacto on the production and culturable rhizosphere microbiota. European Journal of Soil Biology 45: 44-51.
- Radwan, T.E.E., Z.K. Mohamed e V.M. Reis. 2004. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39(10): 987-994.
- Reis-Junior, R.B., M.F. Silva, K.R. Teixeira, S. Urquiaga e V.M. Reis. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. Revista Brasileira de Ciência do Solo 28(1): 103-113.
- Reyes, I., L. Álvarez, H. El-Ayoubi y A. Valery. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro 20(1): 37-48.
- Rodríguez, E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology 44(4): 990-991.
- Rodríguez, V.M., dos Santos, S., Polon, V., Freitas, J.G., Boller, P. e A. Parada. 2005. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. Revista Brasileira de Ciência do Solo 29: 345-352.
- Roncallo, B., E. Torres y M. Sierra. 1998. Producción de vacas de doble propósito suplementadas con frutos de Algarrobbillo (*Pithecellobium saman*) durante las lluvias. pp. 257 -270. En: Sanchez, M.D y M.R. Méndez (eds.). Agroforestería para la Producción Animal en América Latina – II. FAO. Roma. <http://www.fao.org/docrep/006/y4435s/y4435s00.HTM>.; consulta: julio 2010.
- Ruíz, M., E. Armada, Y. Muñoz, I. García, R. Aroca, J.M. Ruíz and R. Azcón. 2011. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. Journal of Plant Physiology 168(10): 1031-1037.
- Saikia, S.P., D. Bora, A. Goswami, K.D. Mudoi and A. Gogoi. 2012. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. African Journal of Microbiology Research 6(6): 1085-1102.
- Terry, E., A. Leyvay A. Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Revista Colombiana de Biotecnología 7(2): 47-54.
- Tripathi, J., A.K. Singh, P. Tiwari y M. Menaka. 2013. Comparative effectiveness of different isolates of

Azospirillum on nitrogen fixation and yield and yield attributing characters of tomato in Chhattisgarh. African Journal of Microbiology Research 7(28): 3615-3620.

Viloria de la Hoz, J. 2003. La ganadería bovina en las llanuras del caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional No. 40. En: Banco

de la República, <http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/DTSER-40.pdf>. 86 p.; consulta: julio 2010.

Zambrano, J.A. y L. Díaz. 2009. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. Universitas Scientiarum 13(2): 162-170.