

EVALUACIÓN DE DIVERSAS INTERACCIONES ENTRE BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp* y *Rizhobium sp* SOBRE LA FASE VEGETATIVA DEL LULO (*Solanum quitoense*).

Jacome Francisco 12332024¹, Morantes Katerine 12332021², Quintero Yessica 12332012³, Redondo Felipe 12332015⁴, Acevedo Carlos ⁵

Fraedja0321@yahoo.es¹, katiimorantes_16@hotmail.com², yessiquintero12@hotmail.com³, hugofelipez@hotmail.com⁴, timoncar2@gmail.com⁵

1,2,3,4 Estudiantes del programa Microbiología Industrial Quinto semestre UDES
5 Director del proyecto, Profesor asociado al programa de Microbiología Industrial UDES

RESÚMEN

El lulo (*Solanum quitoense*), es un frutal andino importante en Colombia, siendo escaso con respecto a la gran necesidad; es importado desde Ecuador, para suplir la demanda nacional. La siembra se desarrolla casi exclusivamente con materiales locales, el 74% de las plantaciones de lulo, en Colombia, se realizan en esquemas de economía campesina, con base en el conocimiento tradicional y recomendaciones técnicas. Se han señalado una serie de factores que favorecen y potencian la producción de esta planta, como también las oportunas investigaciones que se deberían llevar a cabo para el mejoramiento de ésta, donde se incluye el estudio de microorganismos benéficos que se puedan utilizar como biofertilizantes, en este caso fijadores de nitrógeno, que puedan favorecer el desarrollo y estimular el crecimiento.

En este estudio se emplearon tres cepas suministradas por el docente, las cuales se utilizaron para crear tratamientos combinados entre ellas; en medio Rojo congó modificado líquido. Estos tratamientos fueron aplicados para establecer una relación física entre la planta a través de sus raicillas y las bacterias fijadoras de nitrógeno: *Azotobacter sp* (A), *Azospirillum sp* (B) y *Rizhobium sp* (C), evaluando por medio de análisis destructivo, cuál de los diferentes tratamientos (A+B, A+C, B+C A+B+C) proporcionaba mejores resultados para el desarrollo y crecimiento del lulo, teniendo como control para realizar las comparaciones una porción de las siembras sin tratamiento. Obteniendo como resultado que es más eficiente el uso del tratamiento A+C en relación al crecimiento y desarrollo del Lulo (*Solanum quitoense*).

PALABRAS CLAVES: Bacterias fijadoras de Nitrógeno, *Solanum quitoense*, *Rizhobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*.

INTRODUCCIÓN

El lulo (*Solanum quitoense*), es una planta de la familia *Solanaceae*, género *Solanum*, que comprende entre 11 y 13 especies (Whalen et al, 1981; Heiser, 1993; Bohs, 2004), de las cuales 8 se encuentran en Colombia (Whalen et al., 1981; Lobo y medina, 2000).

El lulo fue considerado especie promisoras para el área Andina hace más de 80 años (Popenoe, 1924), siendo esto confirmado por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos de América (1975), y Lobo (2000), la agrupó en el conjunto de frutales andinos con potencial.

En Colombia se siembra alrededor de 5.500 ha, con una proyección de crecimiento de 6.533 ha adicionales (Arias et al., 2006). La oferta nacional es deficitaria con importaciones crecientes, desde el Ecuador. El 74% de las plantaciones de lulo, en Colombia, se realizan en esquemas de economía campesina (Ríos et al., 2002), casi exclusivamente con materiales locales, con base en el conocimiento tradicional y recomendaciones técnicas.

Lobo (Lobo et al., 2002, 2007), señaló una serie de factores que favorecen y potencian la producción (<http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/Vol.10N2Art.5.pdf>) de este frutal, entre los que incluyó: variabilidad genética amplia del taxón y especies relacionadas en la zona Andina; nichos apropiados para su siembra; potencial agroindustrial, entre otros.

Este taxón fue incluido en el Plan Frutícola de Colombia, lo cual requiere desarrollar investigación en diversas áreas como producción limpia, manejo agronómico, eco-fisiología, pos-cosecha (http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Manejo%20poscosecha%20y%20evaluacion%20de%20la%20calidad%20en%20lulo.pdf), entre los cuales sería de gran importancia incluir el estudio de microorganismos que permitan mejorar el desarrollo y crecimiento de esta planta, reduciendo así, el tiempo de fructificación y mejorando el desarrollo y crecimiento de la planta, suministrándole por ejemplo alguna fuente de nutriente indispensable como el nitrógeno.

El nitrógeno es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno (<http://www.redalyc.org/pdf/573/57321110.pdf>) es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima

nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como bacterias fijadoras de nitrógeno (<http://www.bosquesmediterraneos.com/wp-content/documentos-pdf/bacterias-fijadoras-nitrogeno.pdf>) y/o rizobios (<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>), en el cual hace parte *Rhizobium sp*, bacilos móviles, Gram-negativos, procariotas, aerobios, beta (digiere la hemoglobina), su desarrollo es más óptimo a una temperatura de 25 °C (77 °F), sus dimensiones son de 0.5-0.9 x 1.2-3.0 µm. Esta bacteria induce en las raíces (o en el tallo) de plantas (mayormente leguminosas), la formación de estructuras especializadas, los nódulos (<http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v38n1/v38n1a06.pdf>), dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio. Sin embargo, no todas las bacterias fijadoras de nitrógeno forman estos nódulos, algunas bacterias de vida libre como *Azotobacter sp*, que es una bacteria Gram-negativa, móvil, que se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y en aguas frescas, son células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 µm de diámetro, las cuales son utilizadas en biotecnología por su capacidad de producir alginatos y nitrógeno en fermentaciones, además de favorecer a algunas plantas fijando aproximadamente 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido (<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>), el cual una parte es desechado y tomado por dichas plantas. Entre estos fijadores de nitrógeno también se destaca *Azospirillum sp*, es un género de bacterias de la subclase *alfa proteobacteria* dentro de la familia *Rhodospirillaceae* que son diazotrofos (<http://www.agriculturaecologicaonline.com/microorganismos/azospirillum.html>), asociados con las plantas, siendo muy utilizado en la agricultura como biofertilizante (abono biológico).

Teniendo en cuenta la importancia de mejorar el desarrollo del lulo, y la capacidad de algunas bacterias que pueden influir en esto como promotoras de crecimiento vegetal (<http://mingaonline.uach.cl/pdf/bosque/v30n2/art02.pdf>), se busco determinar el efecto y la relación que puede haber entre esta planta frutícola (*Solanum quitoense*) y 3 cepas (*Rhizobium sp*, *Azospirillum sp* y *Azotobacter sp*.) suministradas por el docente, las cuales fueron aisladas previamente del buchón de agua (*Eichhornia crassipes*). Además, sabiendo que las bacterias mantienen diferentes relaciones ya sean positivas o negativas entre ellas para potenciar o disminuir su actividad respectivamente; se buscó determinar si diferentes tratamientos con la combinaciones de estas 3 cepas (*Rhizobium sp*, *Azospirillum sp* y *Azotobacter sp*.), se conseguía algún efecto y una mejor relación promoviendo el desarrollo y crecimiento de la planta del lulo (*Solanum quitoense*).

METODOLOGÍA

Preparación de tratamientos con *Azotobacter sp* (A), *Azospirillum sp* (B), *Rizhobium sp* (C) .

Medios de cultivos y Gram de las cepas.

- Siembra de cepas en Agar Rojo congo (*Azospirillum spp*), Agar Asbhy (*Azotobacter spp*), Agar levadura manitol (*Rizhobium spp*).

Evaluación de la interacción entre las cepas

- Se sembraron las cepas en Agar Rojo Congo de la misma forma en la que se establecieron los tratamientos para saber si estas establecían una relación positiva o negativa.
- Se prepararon los tratamientos en medio líquido, utilizando los componentes del

medio Rojo Congo pero sin Agar-Agar, en donde se inocularon las cepas aisladas de Buchon de agua (*Eichhornia crassipes*), empleando cuatro formas de tratamiento (A+B, A+C, B+C, A+B+C).

Preparación y pasos tenidos en cuenta en la siembra y trasplante del lulo.

Pre-tratamiento de la semilla

- De una fruta de lulo se extrajeron las semillas, que posteriormente se lavaron y se secaron al sol, para luego ser sembradas en las próximas 24 horas.

Siembra

- En cajas de siembra con turba se sembró 1 semilla de lulo por cada espacio, a una profundidad de 2-3 cm manteniendo la humedad del medio, sembrándose en total 90 semillas.

Trasplante

- Pasados 45 días después de la siembra se trasplantaron las plántulas a bolsas plásticas con turba. Antes de esto se realizo la división de las plántulas que habían crecido por el número de tratamientos, empleándose 17 plántulas por cada uno, teniendo en cuenta que se utilizaron 17 sin ningún tratamiento, como control. Posteriormente se sumergieron las raíces de las plántulas durante 2 minutos en los respectivos caldos que contenían los tratamientos realizados, esto para que los microorganismos se adhirieran a las raicillas de la plántula.
- Después de esto se realizo un seguimiento periódico para mantener las condiciones adecuadas de la siembra, llevando una bitácora en donde se registraron las observaciones de los diferentes cambios que se iban presentando en las plántulas de lulo.

Análisis y observaciones

Análisis destructivos

- Se realizó un análisis destructivo periódico en donde se tomaban 2 plántulas de cada tratamiento, para registrar los datos de las variables, longitud tallo, longitud de raíz y diámetro del tallo.
- En total se realizaron 3 análisis destructivos (caracterización y observaciones).

Análisis de resultados

- Una vez recolectadas todas las observaciones, se procesaron por medio de tablas y barras estadísticas para realizar las conclusiones.

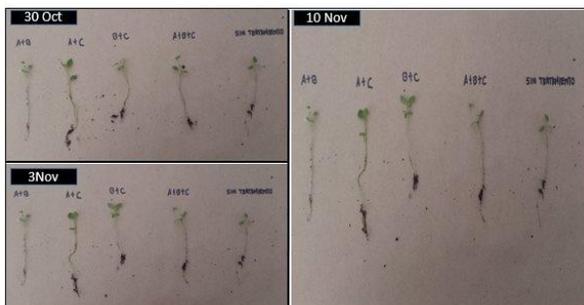


Figura 1: Vista de los tres análisis destructivos realizados.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Antes de evaluar las plántulas de lulo con los tratamientos, se realizó una caracterización de las cepas en las que se incluyó la técnica de tinción de Gram, confirmando la información encontrada en la literatura, que estas bacterias son todas bacilos Gram negativos, variando en la forma de *Azotobacter sp*, que se observó en forma de coco bacilo (Figura 2). Además de una prueba en donde se buscaba conocer si las cepas utilizadas podían crecer y desarrollarse de manera conjunta, sin observarse algún tipo de competencia o inhibición entre ellas.

Utilizándose el medio Rojo Congo y sembrando las cepas en el mismo orden en el que se elaborarían los tratamientos, se pudo determinar que estas cepas podían crecer juntas (Figura 2).

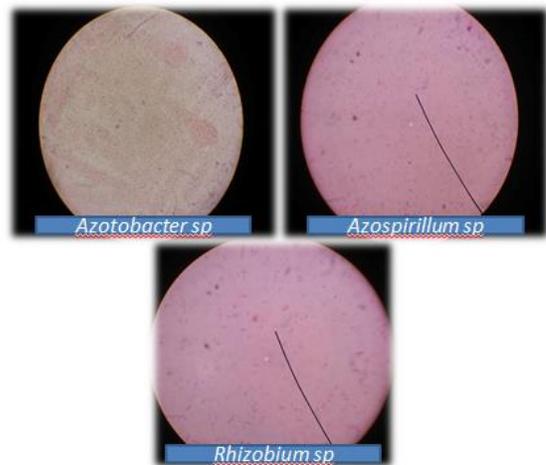


Figura 2. Gram de las Tres Cepas fijadoras de Nitrógeno (*Azotobacter sp*, *Azospirillum sp* y *Rhizobium sp*).

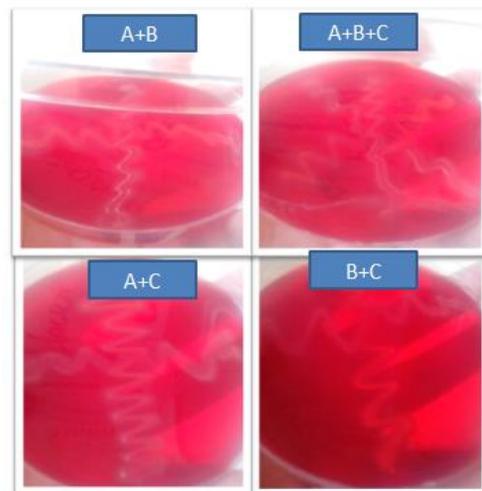


Figura 3. Evaluación de crecimiento de las cepas de forma conjunta.

Se evaluaron en total 85 plántulas de lulo (17 por cada tratamiento), por medio de tres análisis destructivos para determinar las variables. Los datos obtenidos en los tres análisis se observan en las tablas 1,2 y 3 respectivamente.

En la tabla 1 se muestran los valores promedios obtenidos durante el primer análisis destructivo, comparando los distintos tratamientos con las diferentes combinaciones de bacterias y el tratamiento control, Se observa que los mejores resultados son dados por el tratamiento A+C, un comportamiento parecido se muestra en las tablas 2 y 3 en donde los resultados óptimos fueron resultados del tratamiento A+C.

Toma de datos 1					
Tratamiento	A + B	A + C	B + C	A + B + C	Control
Parámetro					
N° Hojas (cm)	3	3	3	3	3
Longitud tallo (cm)	4,8	5,8	4,4	4,5	3,5
Diámetro tallo (cm)	1	1	1	1	1
Longitud raíz (cm)	2,5	2,7	2,6	2,6	2,8

Tabla 1: Datos del primer análisis destructivo (30 octubre)

Toma de datos 2					
Tratamiento	A + B	A + C	B + C	A + B + C	Control
Parámetro					
N° Hojas (cm)	3	4	3	3	3
Longitud tallo (cm)	5	6	4,7	4,8	3,7
Diámetro tallo (cm)	1	1	1	1	1
Longitud raíz (cm)	2,9	2,9	2,8	2,8	3

Tabla 2: Datos del segundo análisis destructivo (3 Noviembre)

Toma de datos 3					
Tratamiento	A + B	A + C	B + C	A + B + C	Control
Parámetro					
N° Hojas (cm)	4	4	4	3	3
Longitud tallo (cm)	5,7	6,9	5	5	4
Diámetro tallo (cm)	1	1	1	1	1
Longitud raíz (cm)	3,2	3,3	3,2	3	3,2

Tabla 3: Datos del tercer análisis destructivo (10 Noviembre)

Los promedios de los diferentes parámetros que se obtuvieron de los tres análisis destructivos se muestran en la tabla 4, el número de hojas no fue muy variable en los cuatro tratamientos, aunque el tratamiento A+C obtuvo un mayor número de hojas con 3,7.

Los parámetros longitud del tallo y longitud de raíz muestran un mejor resultado promedio para el tratamiento A+C. El diámetro del tallo mostro resultados iguales para todos los tratamientos incluyendo el control.

PROMEDIOS					
Tratamiento	A + B	A + C	B + C	A + B + C	Control
Parámetro					
N° Hojas (cm)	3,3	3,7	3,3	3	3
Longitud tallo (cm)	5,17	6,2	4,7	4,8	3,7
Diámetro tallo (cm)	1	1	1	1	1
Longitud raíz (cm)	2,9	3,0	2,9	2,8	3

Tabla 4: Se muestran los promedios de los parámetros evaluados de los tres tratamientos y el control.

El tratamiento (A+C) conformado por las interacciones entre *Rizhobium* y *Azotobacter* proporcionaron los mejores resultados de los parámetros tomados en cuenta como se observa en la figura 4 , aunque las diferencias entre los distintos tratamientos no son tan amplias; se logró apreciar un mejor crecimiento en cuanto a la longitud del tallo y la raíz en las plántula tratadas con dicho tratamiento indicándonos un mejor aprovechamiento de nutrientes en este caso el N₂ por parte de la plántula para su crecimiento con la interacciones entre A y C. En cuanto al número de hojas y el diámetro del tallo fueron parámetros con datos muy estables e iguales para todas las plántulas de los distintos tratamientos en general durante el tiempo de investigación.

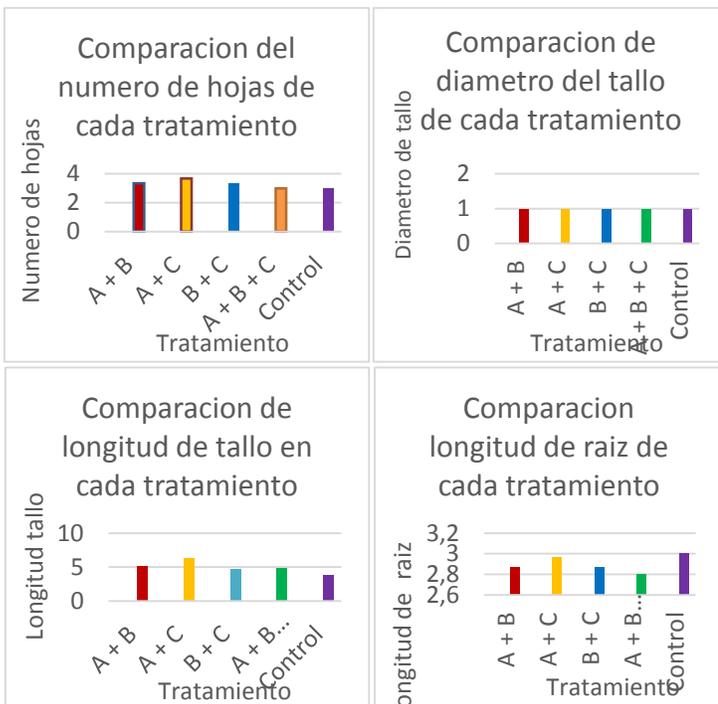


Imagen 4: Análisis estadístico comparativos de los parámetros evaluados en cada tratamiento.

CONCLUSIONES

El tratamiento A+C fue el que influyó mejor en el crecimiento de la planta, evidenciándose en la longitud del tallo y raíz con respecto a los demás tratamientos. Este tratamiento estaba conformado por la interacción entre *Rhizobium* sp y *Azotobacter* sp.

Los tratamientos con *Rhizobium* sp presentaron un efecto estimulante, resultando en un mejor crecimiento de la planta, posiblemente debido a la habilidad de los rizobios para producir hormonas como el ácido indolacético, ácido giberélico y citoquininas, sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, sumando a esto la relación con *Azotobacter* sp, quien tiene una gran capacidad de fijar nitrógeno sin verse afectado por el oxígeno gracias a sus mecanismos de protección, el estímulo hacia la planta pudo haber sido mayor, mejorando el crecimiento, facilitando la obtención de fuentes de nitrógeno asimilables por la planta.

El tratamiento A+B+C fue el que mostró menor efecto benéfico con respecto al crecimiento durante la fase vegetativa de la planta. Esto podría ser, debido a que las tres cepas necesitarían mayores requerimientos, que quizás no se encontraban en el medio, disminuyendo así su metabolismo y por lo tanto sus capacidades para estimular el desarrollo de la planta.

BIBLIOGRAFÍA

1. (Arias et al., 2006).
2. <http://mingaonline.uach.cl/pdf/bosque/v30n2/art02.pdf>. (s.f.).
3. <http://www.agriculturaecologicaonline.com/microorganismos/azospirillum.html>. (s.f.).
4. http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Manejo%20poscosecha%20y%20evaluacion%20de%20la%20calidad%20en%20lulo.pdf. (s.f.).
5. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>. (s.f.).
6. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>. (s.f.).
7. <http://www.bosquesmediterraneos.com/wp-content/documentos-pdf/bacterias-fijadoras-nitrogeno.pdf>. (s.f.).
8. <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/Vol.10N2Art.5.pdf>. (s.f.).
9. <http://www.redalyc.org/pdf/573/57321110.pdf>. (s.f.).
10. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v38n1/v38n1a06.pdf>. (s.f.).
11. (Lobo et al., 2002, 2007).
12. Popenoe. (1924).
13. (Ríos et al., 2002).
14. (Whalen et al., 1981; Heiser, 1993; Bohs, 2004).
15. (Whalen et al., 1981; Lobo y medina, 2000).

