

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/258048417>

Conozcamos el componente biológico del suelo para un desarrollo sostenible del cultivo de arroz

Book · January 2012

CITATIONS

0

READS

317

4 authors, including:



[Daniel Uribe-Vélez](#)

National University of Colombia

35 PUBLICATIONS 128 CITATIONS

SEE PROFILE



[Ivonne Gutiérrez](#)

Pontificia Universidad Javeriana

18 PUBLICATIONS 63 CITATIONS

SEE PROFILE



[Javier Vanegas](#)

Universidad Antonio Nariño

8 PUBLICATIONS 32 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Biodegradación de carbofuran y carbaril por *Sphingomonas* S8-M3-13 en condiciones in vitro [View project](#)



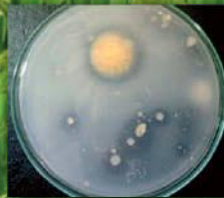
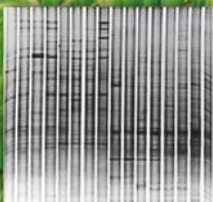
Análisis de la actividad lignocelulolítica de microhongos edáficos de los Llanos Orientales [View project](#)



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Ecología de microorganismos rizosféricos asociados a cultivos de arroz de Tolima y Meta

Daniel Uribe-Vélez
Luz Marina Melgarejo
EDITORES



**Ecología de microorganismos
rizosféricos asociados a cultivos
de arroz de Tolima y Meta**

Daniel Uribe-Vélez
Luz Marina Melgarejo
Editores

**Ecología de microorganismos
rizosféricos asociados a cultivos
de arroz de Tolima y Meta**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Bogotá, D. C., marzo de 2012

© Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Biotecnología

© Daniel Uribe-Vélez
Luz Marina Melgarejo
EDITORES

ISBN 978-958-761-102-1

PORTADA

Ángela Pilone Herrera

FOTOS

Daniel Uribe-Vélez

Grupo microbiología agrícola

PREPARACIÓN EDITORIAL E IMPRESIÓN

Editorial Universidad Nacional de Colombia

www.editorial.unal.edu.co

direditorial@unal.edu.co

Primera edición, 2012

Bogotá, D. C. Colombia

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales

Impreso y hecho en Bogotá, D. C. Colombia

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Ecología de microorganismos rizosféricos asociados a cultivos de arroz de Tolima y Meta
/ editores Daniel Uribe-Vélez, Luz Marina Melgarejo. – Bogotá : Universidad Nacional
de Colombia. Instituto de Biotecnología, 2011

192 p.

Incluye referencias bibliográficas

ISBN : 978-958-761-102-1

1. Análisis de suelos 2. Fertilidad del suelo 3. Microbiología de suelos 4. Arroz -
Cultivo – Colombia I. Uribe Vélez, Daniel, 1967- II. Melgarejo Muñoz, Luz Marina, 1965-

CDD-21 631.4 / 2011

Contenido

Prólogo	15
Daniel Uribe-Vélez	
1 El componente microbiano del suelo como una herramienta para el desarrollo sostenible del cultivo de arroz	19
Microorganismos como componentes esenciales de los servicios del ecosistema	21
El enriquecimiento de grupos funcionales en arroz a través de la aplicación de inoculantes	25
Conclusiones	28
Agradecimientos	29
Referencias	29
Luis Armando Castilla-Lozano, Javier Vanegas, Janeth Rodríguez, Daniel Uribe-Vélez	
2 Evaluación de la fertilidad en suelos de las zonas arroceras de Tolima y Meta	33
Fundamentos del análisis de la fertilidad de los suelos	34
Tolima y Meta como zonas productoras de arroz	35
Análisis de la fertilidad de suelos de la zona arroceras de Meta y Tolima	36
Análisis de fertilidad del suelo de las fincas arroceras de Meta	41
Análisis de fertilidad del suelo de las fincas arroceras de Tolima	45
Conclusiones	49
Agradecimientos	49
Referencias	50

Javier Vanegas, Catalina Camelo, Janeth Rodríguez,
Luz Marina Melgarejo, Daniel Uribe-Vélez

3	Abundancia de diazótrofos, actividad nitrogenasa y proteasa en cultivos arroceros de los departamentos de Tolima y Meta	53
	Estimación de la abundancia de diazótrofos en cuatro zonas productoras de arroz en los departamentos de Tolima y Meta	54
	Determinación de la actividad nitrogenasa y proteasa en suelos arroceros	56
	Conclusiones	63
	Agradecimientos	63
	Referencias	63
	Mayra Beltrán, Catalina Camelo, Luz Marina Melgarejo, Javier Vanegas, Daniel Uribe-Vélez	
4	Actividad fosfatasa y microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato en suelos arroceros de Tolima y Meta	69
	Estimación de la población de microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato en suelos productores de arroz de Tolima y Meta	72
	Determinación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina	79
	Conclusiones	84
	Agradecimientos	85
	Referencias	85
	Ivonne Gutiérrez-Rojas, Adriana Matiz-Villamil, Mauricio Aguirre-Morales, Edgar Reyes-Pineda, Sylvia Natalia Lemos-Gordo, Johanna Milena Méndez-Pedraza, Ángela Judith Núñez-Arbeláez, Luz Natalia Parra-Fajardo, Andrea Alfonso-Piragua, Diego Avendaño-Herrera, Luz Marina Melgarejo, Catalina Camelo, Janeth Rodríguez	
5	Estimación de poblaciones de microorganismos ligninolíticos y celulolíticos, y actividad β-glucosidasa en agrosistemas de arroz	89
	Celulosa, hemicelulosa y lignina	91
	Estimación de poblaciones microbianas con actividad ligninolítica y celulolítica en cultivos de arroz	93
	Actividad enzimática β -glucosidasa en suelos en cultivos de arroz inundado y seco	102
	Conclusiones	105

Agradecimientos	105
Referencias	105

Giovanna Landazábal, Daniel Uribe-Vélez

6	Determinación de la diversidad de microorganismos rizosféricos no cultivables asociados a suelos arroceros de los departamentos de Tolima y Meta	111
	Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente denaturante	112
	Determinación de la estructura de las comunidades microbianas en cultivos de arroz	114
	Índices de diversidad de bacterias y hongos	120
	Conclusiones	125
	Agradecimientos	126
	Referencias	126

Francy Marentes, Javier Vanegas,
José Neftalí Luna, Daniel Uribe-Vélez

7	Evaluación en campo de microorganismos promotores del crecimiento y celulolíticos	131
	Estudio de caso 1. Efecto de la incorporación del tamo con un microorganismo celulolítico y posterior inoculación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en un cultivo de arroz previamente soqueado en el departamento de Tolima, municipio de Saldaña	133
	Estudio de caso 2. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PCV) y microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) en plantas de arroz en el departamento de Meta, municipio de Castilla Nueva	140
	Conclusiones	145
	Agradecimientos	146
	Referencias	146

Javier Vanegas, Nathalia Flórez-Zapata, Daniel Uribe-Vélez

8	Bioprospección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal para su aplicación en el cultivo de arroz	151
	Aislamiento de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR)	152

Identificación de microorganismos promisorios	158
Determinación taxonómica	162
Ensayos bajo condiciones de invernadero y campo	163
Producción de inoculantes microbianos	165
Formulación de inoculantes microbianos	166
Identificación de mercados potenciales	167
Registro del producto para uso comercial	168
Conclusiones	169
Agradecimientos	169
Referencias	169
Índice temático	179
Índice onomástico	187

Autores

Aguirre-Morales, Mauricio. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Alfonso-Piragua, Andrea. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Avendaño-Herrera, Diego. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Beltrán, Mayra. Estudiante de maestría, Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, mayrabelpi@gmail.com

Castilla-Lozano, Luis Armando. Ph.D. Federación Nacional de Cultivadores de Arroz, Fedearroz, Seccional Ibagué, Tolima, arrozibague@hotmail.com

Camelo, Catalina. Estudiante de Biología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, cataca14@gmail.com

Flórez-Zapata, Nathalia. Estudiante de maestría, Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14-490, nathaliafz@gmail.com

Gutiérrez-Rojas, Ivonne. MS. c. Profesora, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, ivonne.gutierrez@javeriana.edu.co

Landazábal, Giovanna. Estudiante de maestría, Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A 14-490, galandazabalc@unal.edu.co

Lemos-Gordo, Sylvia Natalia. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Luna, José Neftalí. Ing. Agrónomo, Federación Nacional de Cultivadores de Arroz, Fedearroz, Seccional Acacias, Meta, josneftal@hotmail.com

Marentes, Francy. MS. c. Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, francymarentes@yahoo.com

Matiz-Villamil, Adriana. Estudiante de maestría, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, amatiz@javeriana.edu.co

Melgarejo, Luz Marina. Dr. Sci. Profesora asociada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, lmmelgarejom@unal.edu.co

Méndez-Pedraza, Johanna Milena. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Núñez-Arbeláez, Ángela Judith. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Parra-Fajardo, Luz Natalia. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Reyes-Pineda, Édgar. Estudiante de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Rodríguez, Janeth. Ing. Agrónoma, Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14-490.

Uribe-Vélez, Daniel. Ph.D. Profesor asociado, Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14-490, duribev@unal.edu.co

Vanegas, Javier. Estudiante candidato a doctor, Grupo de Microbiología Agrícola, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14-490, jvanegasg@unal.edu.co

A mis padres, Marta Elena y Álvaro,
por darme raíces para valorar mi tierra
y alas para volar por este planeta.

A mi familia, Sandra, Lorenzo y Emilio,
por su paciencia y apoyo incondicional
en todos mis proyectos.

Daniel Uribe-Vélez

A mi familia

Luz Marina Melgarejo

Prólogo

El nuevo orden económico mundial sumado a la dificultad para hacer predicciones certeras en torno a un régimen climático cada vez más cambiante, ha planteado la necesidad de desarrollar estrategias más holísticas para mejorar los niveles de producción actuales en cultivos de interés mundial como el arroz. En Colombia esta situación cobra gran interés por ser un país de vocación agrícola y del que un número importante de sus habitantes derivan su sustento de esta actividad, lo que a su vez, incurre en un gran impacto social, siendo el arroz un buen ejemplo de ello como lo demuestran las más de quinientas mil familias ubicadas en 211 municipios que derivan su sustento de la siembra y manejo en más de 460 000 ha en promedio que se siembran anualmente en el país de este cereal.

Históricamente en Colombia se ha cultivado el arroz en cuatro zonas geográficas: la zona Centro (Tolima, Huila y Valle del Cauca), la zona de los Llanos Orientales (Meta y Casanare) y las zonas conocidas como Caribe húmedo (Antioquia, Bolívar, Córdoba y Sucre) y Caribe seco (Cesar, La Guajira, Santander y Norte de Santander). Los estudios más recientes del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), muestran que alrededor del 50 % del área de Colombia tiene problemas de erosión; este 50 % se concentra precisamente en las áreas de mayor producción agropecuaria, las cuales concuerdan con las zonas Central, Caribe seco y Caribe húmedo mencionadas antes, y en zonas de acelerado desarrollo como los Llanos y la Amazonia, donde la erosión afecta más rápidamente (2 a 10 años) la capacidad productiva de los suelos.

El deterioro en las condiciones físico-químicas del suelo, sumado a la disminución de la materia orgánica del mismo, tiene efectos dramáticos sobre la eficiencia de la nutrición vegetal, haciendo que el uso de fertilizantes químicos se intensifique, al punto que en los últimos diez años la utilización de la fertilización nitrogenada en los cultivos de arroz pasó de 100 kg/ha a 230 kg/ha. Este incremento en el uso de fertilización nitrogenada influye enormemente en los costos de producción del cultivo, ya que la sola fertilización de nitrógeno alcanza un valor cercano al 20 % de los costos totales de producción, y la fertilización, en general, un costo que está alrededor del 30 %.

Hoy en día existen suficientes evidencias que indican que, independientemente del tipo de cultivo, los suelos ácidos y tropicales bajo explotación

agrícola requieren un particular seguimiento de sus propiedades biológicas, ya que los microorganismos determinan la disponibilidad de nutrientes, agua y aire para las plantas. La materia orgánica, y muy especialmente los microorganismos que forman parte de esta, se ven gravemente afectados por las prácticas agrícolas inapropiadas, al alterar los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo, que determinan la salud y calidad nutricional del suelo. De allí se desprende que para generar una estrategia orientada a reducir los costos de producción, y en especial los de fertilización, es preciso conocer las características biológicas de los suelos por cultivar. Entre estas características cabe destacar la capacidad metabólica microbiana, la cual permitirá identificar cuál es la capacidad de llevar a buen término un adecuado ciclaje de nutrientes en el suelo y predecir cuál será su evolución bajo la influencia de un cultivo como el arroz, permitiendo de esta forma hacer enmiendas microbianas que restituyan las propiedades biológicas del suelo.

Para efectos del desarrollo de este libro se va a hacer énfasis en un análisis que tomó como punto de referencia 16 fincas arroceras ubicadas en la zona Centro y de los Llanos Orientales, donde se lleva a cabo alrededor del 70 % de la producción arrocera del país. Ambas zonas han sido seleccionadas por presentar situaciones contrastantes desde el punto de vista de fertilidad, características físico-químicas del suelo y diferencias en los sistemas de siembra del cultivo. En este contexto, en la zona Centro predominan suelos tendientes a pH neutro, bastante fértiles y con un sistema de cultivo por inundación. Por otra parte, en los Llanos Orientales predominan suelos ácidos, poco fértiles y con sistemas de producción inundado y seco.

Infortunadamente, a pesar de la importancia del componente biológico en el funcionamiento de los ecosistemas agrícolas, en Colombia son muy pocos los productores que realizan un diagnóstico inicial de las propiedades biológicas de los suelos que van a explotar, y mucho menos un constante seguimiento de sus cambios a través de los diferentes ciclos de cultivo. Sin embargo, es evidente que los microorganismos desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento de un ecosistema agrícola, gracias a la prestación de una serie de servicios ambientales, entre los que se incluye el ciclaje de nutrientes, como bien se explica en el primer capítulo de este libro. Por tal motivo, el desarrollo sostenible de la agricultura necesariamente debe incorporar un manejo mucho más racional del recurso suelo, dado que es uno de los principales patrimonios del agricultor.

Atendiendo a la necesidad de comprender la función que cumplen los microorganismos en el ecosistema agrícola del arroz, en el presente trabajo los autores se han propuesto determinar las propiedades biológicas, bioquímicas, físicas y químicas de 16 suelos de fincas productoras de arroz de los departamentos de Tolima y Meta, provenientes de sistemas de producción de riego y seco. De esta forma, luego del primer capítulo introductorio,

donde se plantea el papel fundamental que cumplen los microorganismos en el ecosistema agrícola, el libro se enfoca inicialmente en una descripción detallada de las características físico-químicas que definen los suelos de estas 16 fincas (capítulo 2); en este contexto, cabe señalar que a partir de dicha caracterización se identificaron cuatro subregiones localizadas: en el norte de Tolima (en los municipios de Armero y Lérica), sur de Tolima (municipios de Saldaña y Purificación), cultivos secanos en Meta (localizados en el municipio de Villavicencio) y los cultivos inundados de Meta (localizados en el municipio de Castilla la Nueva, Acacías y Villavicencio). Partiendo de esta caracterización de los suelos de la región, en los capítulos 3 a 5 se describen los elementos biológicos y bioquímicos asociados con grupos funcionales de microorganismos que intervienen con los ciclos de nitrógeno, fósforo y carbono, respectivamente; en cada capítulo se plantea una discusión en torno al papel de estos grupos funcionales en los cultivos bajo estudio.

En el capítulo 6 se hace un análisis de la estructura de la comunidad microbiana de los microorganismos procarióticos y eucarióticos no cultivables asociados a la rizósfera de las fincas de arroz analizadas; los resultados de este análisis muestran la importancia de los factores físicos, químicos y de manejo en la definición de dicha estructura microbiana. Posteriormente, en el capítulo 7, se muestran los resultados de la aplicación en campo de enmiendas microbianas diseñadas para el mejoramiento de la nutrición en los cultivos de arroz, destacándose la aplicación de microorganismos celulolíticos en una soca en el municipio de Saldaña, que arrojó incrementos en producción del orden del 25 %. Por último, en el capítulo 8, se hace una descripción de los pasos fundamentales que se deben seguir en un proceso de investigación y desarrollo diseñado para el aislamiento, la evaluación, selección y comercialización de microorganismos con potencial biotecnológico, para ser empleado como promotor de crecimiento vegetal en los cultivos de arroz.

El componente microbiano del suelo como una herramienta para el desarrollo sostenible del cultivo de arroz

Daniel Uribe-Vélez^{1*}

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, D.C.

* duribev@unal.edu.co

El arroz es el segundo alimento más utilizado en todo el mundo después del trigo, pero posiblemente representa el cultivo más importante debido a su papel preponderante en la seguridad alimentaria del planeta, ya que cerca de 2000 millones de personas dependen de este cultivo para su sustento diario. El arroz se cultiva en más de 100 países, con un área cultivada de alrededor de 153 millones de hectáreas y una producción de más de 600 millones de toneladas anuales en todo el mundo (Prasanna, Nain, Pandey & Nayak, 2010). En Colombia, según el DANE, en los últimos diez años se han sembrado en promedio alrededor de 457 000 hectáreas, para una producción anual promedio de 2 224 000 toneladas.

La agricultura global actualmente está enfrentando una serie de retos coyunturales para su desarrollo, debido en buena medida a los altos precios en los insumos básicos asociados a la agricultura. Estos altos precios se deben a una serie de factores cuyo desenlace ha tenido implicaciones globales. Entre estos factores merece destacar los altos precios de las energías fósiles generados por la crisis mundial del petróleo, la urbanización de las tierras de vocación agrícola, el cambio climático, así como el alto crecimiento económico de países densamente poblados como China e India (Godfray *et al.*, 2010; OECD-FAO, 2008). Esta situación es incluso más crítica si se considera que para el año 2050 nuestro planeta deberá producir entre 70 y 100 % más alimentos en relación con lo que en la actualidad se produce, en prácticamente el mismo suelo (o menos) que hoy estamos empleando en la agricultura (Godfray *et al.*, 2010).

La situación descrita arriba plantea el reto de desarrollar estrategias tendientes al incremento en los rendimientos de todos los productos agrícolas de primera necesidad en el corto y mediano plazo. Particularmente, en el

caso del arroz, estos rendimientos a nivel mundial oscilan entre 1 t.ha⁻¹ en cultivos con bajo nivel de tecnificación y pobre abastecimiento de agua, hasta alrededor de 10 t.ha⁻¹, en cultivos con condiciones adecuadas de irrigación y buen nivel de tecnificación, lo cual representa un promedio mundial de alrededor de 4,2 t.ha⁻¹ (Prassana *et al.*, 2010; Zeigler y Barclay, 2008). Para el caso de Colombia, el rendimiento promedio en los últimos diez años es de 4,87 t.ha⁻¹, incluyendo el arroz mecanizado y manual o poco tecnificado, aunque este último no llega a representar más del 6 % de la producción nacional (Fedearroz, 2011).

En las últimas cinco décadas la producción de los granos, en general, se ha más que duplicado, a pesar de que el incremento en el uso de suelo arable para la agricultura ha aumentado únicamente en un 9 % (Pretty, 2008). En el caso del cultivo del arroz, estos incrementos han estado sustentados fundamentalmente en la generación asistida por marcadores moleculares de nuevas variedades resistentes a factores bióticos (plagas y enfermedades) y abióticos (salinidad, suelos pobres), así como variedades con mejor calidad en el grano y variedades de ciclo corto. Por otra parte, los desarrollos han estado enfocados en generación de nuevos herbicidas y fertilizantes, mecanización del cultivo, manejo sitio dirigido de nutrientes, manejo integrado de plagas, optimización del riego y del manejo poscosecha, entre otros factores (Zeigler y Barclay, 2008). En nuestro país este proceso ha sido liderado por Fedearroz (Federación Nacional de Arroceros) entidad que ha estado a tono con las necesidades del sector y ha cumplido las expectativas generadas para el cultivo a nivel mundial.

El escenario descrito plantea un gran reto mundial para los próximos 40 años, el cual consiste en prácticamente duplicar la producción agrícola, empleando sustancialmente la misma tierra y enfrentando nuevas circunstancias ecológicas generadas a expensas del cambio climático, el cual en nuestro país no es para nada despreciable, toda vez que en la actualidad Colombia está sumida en uno de los más largos y dramáticos periodos de lluvia de la historia reciente del país, con sus obvias consecuencias para el sector agrícola (El Espectador, 2011). Si bien existen grandes expectativas en los programas de fitomejoramiento vegetal, para la generación de nuevas variedades con genotipos de mayor rendimiento de los diferentes cultivos de interés mundial (Tester y Landgridge, 2010), difícilmente esta única estrategia permitirá alcanzar el promedio mundial de las 10 t.ha⁻¹, para el caso del arroz, necesarias para suplir la demanda estimada.

El suelo ha sido el gran olvidado en el diseño de las políticas de mejoramiento de los rendimientos del grano en el ámbito nacional y en el internacional; de hecho, el reporte mundial publicado por el gobierno británico, *Foresight. The Future of Food and Farming* (Final Project Report, 2011), sostiene que de los 11,5 billones de hectáreas con cobertura vegetal en la tierra,

alrededor del 24 % ha sufrido degradación del suelo inducida por algún tipo de actividad humana, efecto que seguramente está ligado al desarrollo, desde los años 1960, de la revolución verde. Es por esto que una de las prioridades del informe del gobierno británico mencionado con anterioridad es la necesidad de generar un programa serio de manejo sostenible del suelo, en los diferentes cultivos a nivel mundial. Sensibles con esta situación, en nuestro país se han venido desarrollando proyectos tendientes a hacer un diagnóstico de la calidad biótica y abiótica de los suelos en las zonas de cultivo de importancia nacional, como el arroz.

En este contexto, el presente libro pretende mostrar un diagnóstico del metabolismo edáfico asociado al nitrógeno (capítulo 3), fósforo (capítulo 4) y carbono (capítulo 5), asociado a 16 unidades productivas de arroz, circunscritas a los departamentos de Tolima y Meta, que constituyen dos de las principales zonas productoras de arroz en el país. Este diagnóstico se hace a través de una aproximación polifásica que comprende el análisis de la presencia de grupos de microorganismos cultivables asociados al ciclaje de los nutrientes de los elementos arriba mencionados, así como la actividad enzimática asociada a los suelos de donde estos han sido obtenidos. Igualmente, se presenta la caracterización de la estructura de la comunidad de microorganismos no cultivables a través de marcadores filogenéticos de hongos y bacterias (capítulo 6). En el presente capítulo se introduce una serie de conceptos que han liderado la formulación y el desarrollo de este estudio, con el objeto de mejorar su comprensión y, de esta forma, contribuir con lo que desde nuestro grupo de investigación se considera debe ser una política no únicamente gremial sino nacional.

Microorganismos como componentes esenciales de los servicios del ecosistema

La comisión internacional denominada *Millenium Ecosystem Assesment* (Evaluación de Ecosistemas del Milenio), fue convocada por las Naciones Unidas en el año 2000 para dar una visión técnica por más de 1300 expertos a nivel mundial, en torno a las consecuencias del cambio del uso de los ecosistemas. En dicha comisión se llegó, entre otros conceptos, al consenso de que los ecosistemas proporcionan una serie de servicios al hombre, los cuales se pueden dividir en cuatro categorías principales, a saber: 1) la producción de recursos (e.g. alimento, fibras, combustible, agua); 2) la promoción de vida dentro del planeta (e.g. formación de suelo, ciclaje de nutrientes, polinización); 3) la regulación de los procesos del ecosistema (e.g. regulación del clima, control de enfermedades, decodificación) y 4) los servicios culturales (e.g. recreación) (Millenium Ecosystem Assesment, 2003).

Los microorganismos, como agentes determinantes de los diferentes procesos que se llevan a cabo en el suelo, desempeñan un papel preponderante

en cada uno de esos servicios. Por esta razón, el desarrollo de una agricultura sostenible en el tiempo debe involucrar el entendimiento de los factores que modulan el papel de estos microorganismos en el suelo, con el objeto de *manipular* su aplicación para el beneficio de la agricultura. De hecho, la sostenibilidad ambiental depende de la salud del suelo, la cual está regulada por los microorganismos; así mismo la producción agrícola depende de la fertilidad del suelo, la cual está igualmente regulada por los microorganismos (Mocalli y Benedetti, 2010). A continuación se describe cómo los microorganismos participan en el desarrollo de los servicios asociados a las categorías 2 y 3, las cuales comprometen más directamente su funcionamiento en el ecosistema, y, además, con el objeto de facilitar la valoración del papel que los microorganismos representan en cada uno de esos servicios, se clasificarán los microorganismos en grupos funcionales.

En cuanto al *servicio de promoción de la vida dentro del planeta*, se encuentra un amplio grupo de microorganismos asociados al ciclaje de nutrientes. Este grupo es particularmente importante para el soporte de las actividades agrícolas, ya que regulan la disponibilidad de nutrientes para la planta. Entre los nutrientes más importantes para la actividad agrícola está el nitrógeno, cuya entrada natural en el ecosistema está determinada a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), pero su permanencia en el mismo está igualmente afectada por la acción de otros grupos funcionales como los amonificantes, nitrificantes, denitrificantes, entre otros, que ejercen una serie de transformaciones de este elemento en el ecosistema, las cuales inciden directamente sobre su disponibilidad para la planta (Myrold, 2005). El fósforo es otro elemento en el cual la actividad microbiana ejerce un gran efecto sobre la disponibilidad para la planta, a través de grupos funcionales como las micorrizas o microorganismos solubilizadores o mineralizadores de fosfato. Estos microorganismos dejan disponible dicho elemento, gracias a la mineralización de compuestos orgánicos o la desestabilización de las sales de fosfato insolubles presentes en el suelo, particularmente en agroecosistemas tropicales (Scheublin *et al.*, 2010; Smith y Read, 1997; Yarzabal, 2010). Otro papel importante en relación con este servicio del suelo es la descomposición de la materia orgánica, la cual se puede entender de forma general como la mineralización del carbono, función que es el complemento catabólico del proceso de la fotosíntesis (Barrios, 2007). Este proceso, generado por la acción conjunta de bacterias, hongos, protozoarios e invertebrados, consiste básicamente en la fragmentación física, degradación química y lixiviación de sustancias orgánicas que se convierten en una significativa fuente de nutrientes, no únicamente de tipo carbonados sino macro y micronutrientes atrapados en la biomasa vegetal, cuya degradación permite que estén nuevamente disponibles para la planta (Giller *et al.*, 1997).

El otro servicio en el cual los microorganismos toman parte está relacionado con la *regulación de los procesos del ecosistema* (Barrios, 2007; Giller *et al.*, 1997). En este sentido merece destacar la modificación de la estructura del suelo, entendiendo estructura del suelo como la cementación de partículas de arcilla, limo y arena, en conjunto con la materia orgánica disuelta, para formar agregados de diferente tamaño gracias a la acción de agentes orgánicos e inorgánicos (Montenegro, 2003). Esta estructura está definida por la acción de exopolisacáridos de origen microbiano y vegetal, y por la acción de raíces, macrofauna edáfica e hifas de origen fúngico. Merece igualmente resaltar la acción particular de las micorrizas en este sentido, no solo por el gran entramado que generan sus hifas en el suelo, debido a la colonización de diferentes plantas, sino por la producción de la glicoproteína *glomalina*, la cual es determinante en la formación de agregados en diferentes tipos de suelo, además de hacer parte importante de la fracción de carbono recalcitrante (Rilling *et al.*, 2003).

En la regulación de procesos del ecosistema también se encuentra el control de plagas y enfermedades (Barrios, 2007; Giller *et al.*, 1997). Este es un proceso que ocurre de forma natural dentro de los ecosistemas, al punto que en diferentes latitudes se ha reconocido el fenómeno de los llamados *suelos supresivos*, entendidos estos como suelos que poseen la capacidad de limitar el desarrollo o crecimiento de ciertos patógenos (Campbell, 1989; Mazzola, 2004; Garbeva *et al.*, 2004). Este fenómeno ha sido asociado a diferentes factores bióticos y abióticos. Entre los abióticos se pueden mencionar algunas propiedades físico-químicas del suelo, debido a la acción de ciertas fracciones de arcillas, y entre los factores bióticos, la microflora nativa del suelo (Campbell, 1989; Garbeva *et al.*, 2004). Algunos autores sugieren que el principal factor que determina la supresividad de un suelo son las comunidades microbianas del mismo, ya que luego de ser esterilizado, este permite más fácilmente el desarrollo del patógeno, en comparación con un suelo no esterilizado, además de que esta capacidad puede ser transferible a otros suelos a partir de pequeños inóculos (Malajczuk, 1983; Cook y Baker, 1983; Campbell, 1989).

En este contexto, es posible pensar que la manipulación de la comunidad microbiana nativa antagonista podría ser una estrategia viable para el manejo de enfermedades. Sin embargo, para que esto sea posible es necesario identificar el componente biológico asociado a dicha condición de supresividad, con el objeto de poder monitorear el impacto de las prácticas de manejo agrícola sobre la abundancia y actividad de la población microbiana de interés. Merece mencionar que esta situación puede llegar a ser bastante compleja, ya que la supresividad de un suelo podría estar relacionada, además de la población específica de antagonistas, con un mejor estatus nutricional

del cultivo, producto de la acción de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (Mazzola, 2004; Barrios, 2007).

La fuente más importante de diversidad microbiana en el planeta se encuentra en el suelo, y es básicamente desconocida. A pesar de la relevancia de los microorganismos en los diferentes procesos y servicios que estos prestan al ecosistema en el suelo, rara vez son incluidos en los modelos globales de funcionamiento como una herramienta para el manejo nutricional o de enfermedades del ecosistema. Una de las principales razones para esta omisión radica en la abrumadora diversidad microbiana residente en el suelo (Allison y Martiny, 2008). Se ha estimado que el número total de células procarióticas sobre nuestro planeta oscila entre $4-6 \times 10^{30}$ (Sleator *et al.*, 2008), con 3000 a 11 000 genomas microbianos por gramo de suelo (Schmeisser *et al.*, 2007). Esa gran cantidad de microorganismos no son únicamente filogenéticamente muy diversos, sino funcionalmente muy variados y con un papel crítico por su función ecológica (Rutigliano *et al.*, 2004).

La gran diversidad de microorganismos en el ecosistema ha llevado a pensar que los cambios en las comunidades no altera los procesos biológicos, ya que las comunidades del suelo son redundantes, resilientes o resistentes (Allison y Martiny, 2008). Un suelo se considera redundante desde el punto de vista funcional cuando varios grupos de microorganismos poseen la capacidad de llevar a cabo un proceso determinado a una tasa muy similar, bajo las mismas condiciones ambientales. En el mismo sentido, la comunidad microbiana en el suelo se considera resiliente cuando posee la capacidad de recuperar su composición original luego de un disturbio de origen natural o antropogénico, y dicha comunidad es resistente cuando su estructura no se modifica a pesar de la presencia de un disturbio particular (Allison y Martiny, 2008). Pese a los conceptos arriba mencionados, un buen número de estudios ha mostrado que particularmente ante ciertos estímulos como la aplicación de fertilizantes, la estructura de las comunidades microbianas son altamente sensibles, llegando a alterar incluso su función (Allison y Martiny, 2008; Gu *et al.*, 2009; Waldrop *et al.*, 2000). De manera similar, se ha reportado que, dependiendo de la duración de un disturbio determinado y del grupo taxonómico bajo observación, las comunidades microbianas del suelo son sensibles a los cambios en su estructura y, por ende, en un grado u otro no son completamente resilientes. La pregunta que surge entonces es si esa variación en los cambios de la comunidad conduce igualmente a un cambio en las funciones del ecosistema. En este sentido, Giller *et al.* (1997) y Allison y Martiny (2008) indican que hay un número considerable de estudios que sugieren que algunas funciones del ecosistema son llevadas a cabo por diversos grupos filogenéticos; sin embargo la tasa a la cual una función específica es llevada a cabo por esos grupos puede diferir entre ellos, lo cual puede incidir en el funcionamiento del ecosistema. Por otra parte, estos

autores igualmente señalan que hay ciertas funciones más especializadas que son llevadas a cabo por un grupo más limitado de especies (e.g. la fijación biológica de nitrógeno por *Rhizobium*), cuya pérdida para un ecosistema lo hace más sensible desde el punto de vista funcional.

La situación planteada sustenta la importancia de llevar a cabo estudios relacionados con la determinación de la diversidad microbiana desde el punto de vista filogenético y funcional de aquellos agro-ecosistemas en los cuales se pretenda dar un manejo sostenible del suelo. Sin embargo, una limitación para llevar a cabo estos estudios es que cerca del 99 % de los microorganismos entran actualmente dentro de la categoría de no cultivables, ya que no es posible obtener aislamientos puros en medios de cultivo. Por esta razón, se ha venido desarrollando una serie de técnicas moleculares que consisten en el aislamiento y la caracterización del conjunto de genomas asociados a la comunidad microbiana del suelo (microbioma edáfico), con el objeto de identificar mediante el uso de marcadores moleculares de tipo filogenético o funcional la estructura de la comunidad microbiana asociada a un nicho particular, o mediante el análisis del genoma completo de esta comunidad (metagenoma), identificar nuevas especies, genes o moléculas que tengan aplicaciones puntuales para la biotecnología o la agricultura, y de esta forma contribuir con el desarrollo sostenible en nuestro planeta (Mocalli y Benedetti, 2010).

El enriquecimiento de grupos funcionales en arroz a través de la aplicación de inoculantes

El cultivo de arroz es un agro-ecosistema muy complejo que se puede clasificar de acuerdo con los sistemas de cultivo en: inundado por irrigación, cultivos inundados dependientes de riego y cultivos secanos (Prasana *et al.*, 2010). Según esta clasificación, cerca del 75 % de los cultivos en el mundo se encuentran bajo el sistema de cultivo de inundación, el cual está conformado por tres compartimientos: una fracción anóxica del suelo de soporte, donde el oxígeno es agotado luego de la inundación; luego está la fracción superficial del suelo, donde hay una interfase anóxica/óxica y finalmente se encuentra la fracción óxica asociada a la rizósfera (Liesack *et al.*, 2000). En estas fracciones se puede evidenciar toda una serie de gradientes de oxígeno, así como de aceptores de electrones y compuestos reducidos, los cuales claramente tipifican un ecosistema diverso y complejo, en particular desde el punto de vista de la actividad microbiana (Liesack *et al.*, 2000; Prassana *et al.*, 2010).

Esta diversidad de ambientes generados por la interfase aeróbica/anaeróbica en el ecosistema de arroz, proporciona el hábitat para un grupo diverso de microorganismos. Algunos de estos son grandes movilizadores de nutrientes, entre los que se encuentran los fijadores biológicos de nitrógeno,

solubilizadores, mineralizadores y translocadores de fosfato, oxidadores de azufre, y microorganismos mineralizadores de carbono. El estudio de los diferentes grupos funcionales mediante el uso de las técnicas cultivable y no cultivable, ha permitido el desarrollo de inoculantes como estrategias para el desarrollo sostenible del cultivo, algunos de los cuales han sido exitosamente empleados como inoculantes en cultivos de arroz en el trópico, enmarcados en una estrategia de manejo sostenible de los servicios microbianos al ecosistema a través de biofertilizantes (Uribe *et al.*, 2010) (figura 1.1).

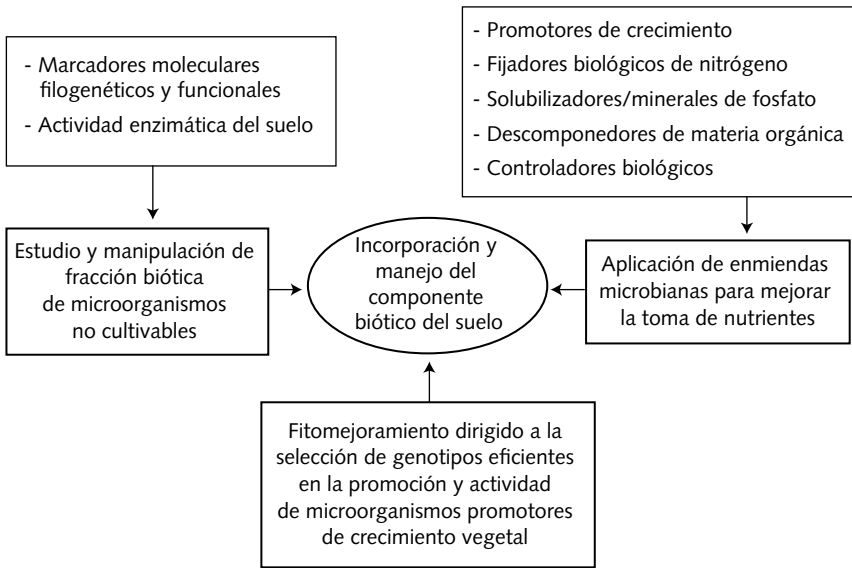


Figura 1.1 Estrategias para la incorporación del componente biótico del suelo en el desarrollo de una agricultura sostenible en arroz.

Fuente: autores

Microorganismos fijadores biológicos de nitrógeno

La diversidad de ambientes generados en el cultivo de arroz bajo inundación permite el establecimiento de diversos grupos de microorganismos fijadores biológicos de nitrógeno o diazotróficos. El estudio de Wartainen *et al.* (2008), basado en la técnica de PCR-DGGE (capítulo 6 para los detalles de la técnica), encontraron 33 unidades taxonómicas operativas (OTU) diferentes, evidenciando de esta forma una gran diversidad de este tipo de organismos asociados al cultivo de arroz. En un estudio similar, Bin *et al.* (2007) encontraron que algunos patrones son específicos de la rizósfera, mientras que otros son endófitos de la planta de arroz. Estos resultados indican que las plantas de arroz presentan un nicho adecuado para el empleo de FBN de nitrógeno como inoculantes comerciales.

Diversos estudios han mostrado efectivamente que el uso de microorganismos diazotróficos es una estrategia rentable en cultivos de arroz. En este sentido, Yanni y El-Fattah (1999) mostraron un incremento del 20 % en los rendimientos de un cultivo de arroz bajo condiciones de campo, al inocular un aislamiento de *Azotobacter sp.*, el cual generó un incremento en la acumulación de nitrógeno alrededor de 15 kg.ha⁻¹. En otro estudio similar se reportó un incremento superior al 22 %, al inocular un cultivo de arroz con una cepa de *Azospirillum lipoferum*, el cual es un microorganismo diazotrófico heterótrofo microaerófilico, frecuentemente aislado de la rizósfera de arroz (Kennedy *et al.*, 2004). Estos resultados indican un potencial de la inoculación de los microorganismos diazotróficos para mitigar el uso de fertilizantes nitrogenados en arroz. Sin embargo, algunos autores sugieren que este efecto está asociado al genotipo de la planta, por lo que es necesario introducir programas de fitomejoramiento que involucren el criterio de selección de genotipos vegetales más eficientes, en la asociación con microorganismos diazotróficos (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellao, 2006). En Colombia, Castilla (2005) evaluó la respuesta de cinco genotipos interespecíficos de arroz, a la inoculación con una mezcla de dos inoculantes diazotróficos: *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense*. En dicho estudio Castilla reportó una respuesta diferencial de los genotipos, destacando que en tres genotipos interespecíficos (incluyendo la variedad Fedearroz 50), encontraron un incremento cercano a 2 t.ha⁻¹, cuando se aplicó una dosis del 100 % de nitrógeno. Estos resultados indican la importancia de hacer una selección genotípica con miras a optimizar la respuesta de rendimiento, producto de la aplicación de inoculantes (figura 1.1).

Microorganismos solubilizadores de fosfato

La rizósfera de arroz es también un nicho adecuado para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF), tanto en cultivos inundados como en cultivos secos (capítulo 4; Panhwar *et al.*, 2009). Sin embargo, se sabe que a pesar de que se ha aislado un gran número de MSF a partir de una diversidad de cultivos en todo el mundo, muy pocos son los inoculantes comerciales desarrollados para su aplicación en agricultura (Yarzabal, 2010). Particularmente en arroz se han evaluado algunos aislamientos con relativamente buenos resultados empleando cepas únicas (Datta *et al.*, 1982; Trivedi *et al.*, 2007) o en co-inoculaciones con FBN (Kundu y Gaur, 1984). En Colombia, Moreno (2007) reportó el uso de un inoculante solubilizador de fosfato a base del hongo *Penicillium janthinellum*, el cual permitió incrementos entre el 5 y el 38 % en rendimiento en comparación con controles no inoculados.

Microorganismos celulolíticos

Otro nicho importante donde la aplicación de inoculantes microbianos puede ser empleada en el cultivo de arroz es en la degradación del material vegetal generado como subproducto de la cosecha. En la mayoría de los países productores de este cereal (y Colombia no es la excepción), el tamo que queda luego de la cosecha es quemado, con el objeto de preparar el terreno para el siguiente ciclo de cultivo (Dobermann y Fairhurst, 2000). De hecho, en Latinoamérica como en Asia, se ha reportado que una de las principales fuentes de generación de gases de invernadero está asociada a los cultivos de arroz, no solo por la producción de metano y óxido nitroso, sino por la quema de los desechos vegetales obtenidos luego de la cosecha del grano (*Final Project Report*, 2011). Esto ha conducido al desarrollo de prácticas que involucran la incorporación del tamo en el suelo, a través de estrategias más sostenibles como la degradación del material vegetal. Dicha incorporación se puede lograr gracias a la acción de microorganismos descomponedores como los hongos filamentosos *Trichoderma spp*, los cuales son conocidos por su gran capacidad de producción de enzimas celulolíticas (capítulo 5). En este sentido merece destacar el trabajo de Man y Ha (2006), quienes muestran cómo la incorporación del tamo en cultivos de arroz mediante el empleo de *Trichoderma spp*. tiene unos efectos en los incrementos del rendimiento del cultivo entre el 27 y 48 % (dependiendo del período de siembra), en relación con los controles no inoculados. Con dicho estudio se demuestra la importancia de introducir este tipo de prácticas en el manejo sostenible del cultivo de arroz, ya que además de mejorar la actividad microbiana del suelo, se mejoran los rendimientos del cultivo. Un estudio similar llevado a cabo en la zona productora del municipio de Saldaña (Tolima) se reporta en este libro en el capítulo 7.

Conclusiones

El desarrollo sostenible en el cultivo de arroz está estrechamente ligado al conocimiento de la actividad microbiana en los suelos, ya que los microorganismos prestan una serie de servicios que son esenciales para la promoción de la vida y la regulación de procesos biológicos dentro del ecosistema. La gran mayoría de microorganismos que toman parte en estos procesos no pueden ser cultivados mediante las técnicas microbiológicas convencionales, por lo que son desconocidos para el hombre. Por consiguiente, es importante llevar a cabo el seguimiento de estos microorganismos no cultivables a través de técnicas moleculares o enzimáticas, con el objeto de manipular y optimizar los procesos que ellos dirigen en el ecosistema edáfico, ya que funciones esenciales para el cultivo del arroz, como el ciclaje de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre, carbono) y el control de

plagas y enfermedades dentro del cultivo, son llevadas a cabo en buena medida por dicha comunidad microbiana.

La aplicación de grupos funcionales puntuales, como los fijadores biológicos de nitrógeno, los solubilizadores, mineralizadores o translocadores de fosfato, así como los descomponedores de material vegetal, ofrecen otra oportunidad para el desarrollo de estrategias ambiental y económicamente más sostenibles, a través del desarrollo de inoculantes que permitan optimizar la toma de nutrientes para el cultivo de arroz. Finalmente, en la interacción planta-microorganismo (inoculante), la planta desempeña un papel muy importante, y por tal motivo se deben generar programas de fitomejoramiento, con el objeto de seleccionar genotipos vegetales que favorezcan la interacción con inoculantes promotores de crecimiento vegetal eficientes (figura 1.1).

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, a través del contrato 2007B6423 161-1020/2007.

Referencias

- Allison, S. D., & Martiny, J. B. H. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105, 11512-11519.
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*, 64, 269-285.
- Bin, C., Si-Ping, Z., Li-Juan, Z., Zhi-Min, L., Ya-Na, S., & Wei-Wen, Z. (2007). Genetic diversity analysis of diazotrophs in the rice rhizosphere. *Chinese Journal of Agricultura Biotechnology*, 4, 253-258.
- Campbell, R. (1989). *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*. Cambridge U.K.: Cambridge University Press.
- Castilla, L. A. (2005). Evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza spp*) a la inoculación con las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en un *Typic haplustalf* de la meseta de Ibagué. Colombia. Tesis (Ph.D. Suelos y aguas). Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, M.N. (USA): American Phytopathological Society.
- Datta, M., Banik, S., & Gupta, R. K. (1982). Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant and Soil*, 69(3), 365-373.
- Doberman, A., & Fairhurst, T. (2000). *Arroz: Desórdenes nutricionales y manejo de nutrientes*. G.A. USA: International Plant Nutrition Institute.

- El Espectador. (2011). Recuperado de: www.elespectador.com/tags/ola-invernal-en-colombia
- Fedearroz. (2011). Recuperado de: http://www.fedearroz.com.co/apr_public.php
- Final Project Report. The Government Office for Science. (2011). *Foresight. The Future of Food and Farming*. London, UK: Author.
- Fuentes-Ramírez, J., & Caballero-Mellao, J. 2006. Bacterial biofertilizers. In Z. A. Siddiqui (Ed.). *GPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 143-172). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Phytopathology*, 42(1), 243.
- Giller, K. E., Beare, M. H., Lavelle, P., Izac, A. M. N., & Swift, M. J. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6, 3-16.
- Godfray, H. C. J. *et al.* (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327, 812-818.
- Gu, Y., Zhang, X., Tu, S., & Lindström, K. (2009). Soil microbial biomass, crop yields, and bacterial community structure as affected by long-term fertilizer treatments under wheat-rice cropping. *European Journal of Soil Biology*, 45, 239-246.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T., & Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1229-1244.
- Kundu, B. S., & Gaur, A. C. (1984). Rice response to inoculation with N₂-fixing and P-solubilizing microorganisms. *Plant and Soil*, 79(2), 227-234.
- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 625-645.
- Malajczuk, N. (1983). Microbial antagonism to Phytophthora. In D. C. Erwin, S. Bartnicki-García & P. H. Tsao (Eds.). *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (pp. 197-218). St. Paul, M.N.: The American Phytopathological Society.
- Man, L. H., & Ha, N. N. (2006). Effect of decomposed rice straw at different times on rice yield. *Omonrice*, 14, 58-63.
- Mazzola, M. (2004). Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopatology*, 42, 35-59.
- Millenium Ecosystem Assesment. (2003). *Ecosystem and Human Well-being: A framework for assessment*. Washington. D.C.: Island Press.
- Mocalli, S., & Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161, 497-505.

- Montenegro, H. (2003). Propiedades físicas de los suelos en relación con la fertilidad. En M. Triana, R. Lara, M. I. Gómez y G. Peñaloza (Eds.). *Manejo integral de la fertilidad del suelo* (pp. 3-21). Bogotá D.C. Sociedad Colombiana de las Ciencias del Suelo.
- Moreno, N. (2007). Producción de biofertilizantes y biocontroladores para una agricultura sostenible. En J. Sánchez (Ed.). *Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas y agro-ecosistemas* (vol. 1, pp. 261-269). Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia,
- Myrold, D. D. (2005). Transformations of nitrogen. In D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel & D. A. Zuberer (Eds.). *Principles and applications of soil microbiology* (pp. 333-372). New Jersey: Prentice Hall.
- OECD-FAO. (2008). *Agricultural outlook 2008-2017*. Paris: OECD Publications.
- Panhwar, Q. A., Radziah, O., Sariah, M., & Ismail, M. R. (2009). Solubilization of different phosphate forms by phosphate solubilizing bacteria isolated from aerobic rice. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(6), 667-673.
- Prassana, R., Nain, L., Pandey, A. K., & Nayak, S. (2010). Exploring the ecological significance of microbial diversity and networking in the rice ecosystem. In P. Dion (Ed.). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Pretty, J. (2008). Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 363, 447-465.
- Rilling, M. C., Ramsey, P. W., Morris, S., & Paul, E. A. (2003). Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and Soil*, 253, 293-299.
- Rutigliano, F. A., D'ascoli, R., & De Santo, V. A. (2004). Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11), 1719-1729.
- Scheublin, T. R., Sander, I. R., Keel, C., & van der Meer, J. R. (2010). Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *The Isme Journal*, 4, 1-12.
- Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 955-962.
- Sleator, R. D., Shortall, C., & Hill, C. (2008). Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 361-366.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis* (2.nd ed.). London: Academic Press.
- Tester, M., & Landgridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327, 818-822.

- Trivedi, P., Kumar, B., Pandey, A., & Palni, L. M. S. (2007). Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102, 291-299.
- Uribe, D., Sánchez-Nieves, J., & Vanegas, J. (2010). Role of microbial biofertilizers in the development of a sustainable agriculture in the tropics. In P. Dion (Ed.). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics* (pp. 235-250). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Waldrop, M. P., Balser, T. C., & Firestone, M. K. (2000). Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1837-1846.
- Wartiainen, L., Eriksson, T., Zheng, W., & Rasmussen, U. (2008). Variation in the active diazotrophic community in rice paddy nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 39, 65-75.
- Yanni, Y. G., & El-Fattah, F. K. A. (1999). Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile delta. *Symbiosis*, 27, 319-331.
- Yarzabal, L. A. (2010). Agricultural development in tropical acidic soils: potential and limits of phosphate-solubilizing bacteria. In P. Dion (Ed.). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics* (pp. 209-234). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Zeigler, R. S., & Barclay, A. (2008). The relevance of rice. *Rice*, 1, 3-10.

Evaluación de la fertilidad en suelos de las zonas arroceras de Tolima y Meta

Luis Armando Castilla-Lozano^{*2}, Javier Vanegas^{*1},
Janeth Rodríguez¹, Daniel Uribe-Vélez^{1**}

¹ Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, D.C.

² Fedearroz, Ibagué

- Estos autores contribuyeron de forma similar en la elaboración del artículo

** duribev@unal.edu.co

La productividad de un suelo es el resultado de la interacción de diversos factores químicos, físicos, biológicos y climáticos, y así mismo, su fertilidad depende de una dinámica ecológicamente favorable y equilibrada de todos los elementos que forman parte del mismo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso del suelo para la agricultura modifica necesariamente este equilibrio; por tanto, la fertilidad y el manejo del suelo se deben evaluar de manera integral, de forma que se asegure su sostenibilidad para el futuro de la humanidad. El manejo de los suelos para la agricultura ha de obedecer a los requerimientos de los cultivos dentro de una determinada condición climática, y optimizar las relaciones físicas, químicas y biológicas del suelo. En la agricultura sostenible, uno de los mayores retos es la búsqueda de alternativas biológicas de factibilidad económica, práctica y ecológica, considerada una prioridad en los programas de investigación agrícola.

El arroz se cultiva en más de cien países con un gran rango de ambientes ecológicos, que van desde arroz seco a inundado, desde los 0 a 3000 msnm, en climas templados y tropicales y suelos de condiciones físicas y químicas muy variadas, como suelos salinos, hasta suelos de alta montaña con concentraciones tóxicas de aluminio (Prassana *et al.*, 2010). Para obtener rendimientos satisfactorios es necesario un suministro adecuado de nutrientes al cultivo. Las condiciones más apropiadas para el arroz se presentan en suelos con pH entre 5 y 7, con texturas medianas a pesadas y con contenido moderado de materia orgánica (Fedearroz, 2000). El terreno debe poseer un adecuado abastecimiento de bases, una buena retención de agua y nutrientes,

una aceptable estabilidad estructural y un equilibrio reducción-oxidación. En Colombia no se encuentran suelos que puedan suministrar adecuada y oportunamente todos los nutrientes, así que siempre hay que recurrir a la fertilización para proporcionar uno o varios de los siguientes elementos: N, P, K, S, Mg, Zn, y en ocasiones micronutrientes como B, Cu ó Ca (Fedearroz, 2000).

El cultivo intensivo de arroz ha conducido al deterioro constante de las propiedades físicas y químicas de los suelos. Esto se ve reflejado en los niveles de producción en lotes de 10 y 20 años de uso donde escasamente se alcanzan 1900 kg/ha de grano de arroz, mientras que lotes relativamente recientes en su uso con prácticas agrícolas similares logran producciones de alrededor de 5800 kg/ha (Fedearroz, 2000). Las malas prácticas, como la labranza intensiva, han ocasionado deterioro de los suelos, lo cual se ve reflejado en el taponamiento de los poros superficiales, impidiendo la infiltración del agua en el suelo, lo que conduce a la compactación, el aumento de la densidad aparente y finalmente la erosión del suelo. Esta situación ha conducido a extremos tales que en algunas fincas arroceras ha desaparecido el suelo. Otra característica del deterioro es el contenido de materia orgánica (MO), el cual, según Fedearroz, hace 20 años oscilaba entre el 3 y el 4 % en algunas zonas, mientras que hoy es común encontrar valores cercanos al 1 % en la mayoría de los suelos productores del país (Fedearroz, 2000), aunque cabe señalar que en los suelos bajo estudio, el contenido de MO oscila entre 2,3- 5,0 % para Tolima y 2,3-3,0 % para Meta (tablas 2.2a y 2.2b respectivamente).

La degradación física y química del suelo, sumada a la disminución de la MO, han intensificado el uso de fertilizantes químicos, al punto que en los últimos diez años la utilización de fertilizantes nitrogenados haya pasado de 100 kg/ha a 230 kg/ha de N. Este incremento influye enormemente en los costos de producción del cultivo, ya que la sola fertilización nitrogenada alcanza un valor cercano al 20 % de los costos totales de producción, mientras la fertilización completa representa alrededor del 30 % de los costos de producción (Castilla, 2006; Quintero *et al.*, 2004).

Fundamentos del análisis de la fertilidad de los suelos

Con el análisis químico del suelo se puede conocer el contenido de nutrientes que están disponibles, hacer un diagnóstico de la fertilidad del suelo, determinar y seleccionar las dosis, fuentes, épocas y sistemas de aplicación de correctivos y fertilizantes. Las propiedades químicas del suelo, como el pH, la capacidad de intercambio catiónico (CIC), la conductividad eléctrica (CE), la MO, tienen relación estrecha con la disponibilidad de los nutrientes para las plantas, lo cual permite hacer un diagnóstico general de la fertilidad del suelo. La interpretación de los resultados del análisis de suelos se realiza comparándolos con rangos críticos establecidos experimentalmente,

que dan una apreciación tanto del contenido como de la deficiencia o exceso y su correspondiente probabilidad de respuesta a la fertilización. Sin embargo, una interpretación completa debe considerar factores como textura, clase de coloides, MO, humedad, antagonismos y sinergismos, saturación en el complejo de cambio, reacción química del medio (pH, oxidación-reducción, presión osmótica), actividad biológica y condiciones físicas (aireación, compactación), lo cual puede variar tanto el “diagnóstico-pronóstico” inicial como la recomendación de fertilización (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Criterios de interpretación de resultados de análisis de suelos.				
Contenido	Disponibilidad	Probabilidad respuesta (%)	Rendimiento relativo (%)	Análisis de factores
Muy bajo	Muy baja	Muy alta (>95)	Muy bajo (<70)	Condiciones que incrementan o que disminuyen disponibilidad
Bajo	Baja	Alta (80 a 95)	Bajo (70 a 80)	
Medio	Media	Media (40 a 60)	Medio (80 a 90)	
Adecuado	Suficiente	Baja (5 a 20)	Normal (90 -100)	
Alto	Alta	Muy baja (<5)	Alto (100)	
Muy alto	Muy alta-excesiva	Ninguna	Subnormal (<100)	

Fuente: adaptado de Frye (2001).

Tolima y Meta como zonas productoras de arroz

En Colombia se cultiva el arroz en cuatro zonas geográficas: la zona Centro (Tolima, Huila y Valle del Cauca), la zona de los Llanos Orientales (Meta y Casanare), la zona Caribe húmedo (Antioquia, Bolívar, Córdoba y Sucre) y Caribe seco (Cesar, La Guajira, Santander y Norte de Santander). Las zonas Centro y de los Llanos Orientales aportan el 70 % de la producción de arroz del país, motivo por el cual la presente investigación se desarrolló en 16 fincas (ocho de Tolima y ocho de Meta) representativas de estas zonas del país.

El departamento de Tolima está ubicado en la zona andina, región sometida a la interacción de las placas tectónicas del Pacífico (placa de Nazca) y Suramericana. Los mayores rasgos morfoTECTÓNICOS son las cordilleras Central y Oriental y el valle del río Magdalena, accidentes relacionados con posibles fenómenos distensivos en el Jurásico y compresivos en el Cenozoico (Cortés y Malagón, 1982). En esta zona predominan suelos entre neutros a alcalinos, con baja concentración de MO y con suelos pertenecientes a los órdenes de Inceptisoles y Alfisoles con un sistema de cultivo de riego por gravedad. Por otra parte, el departamento de Meta, región de la Orinoquía, estuvo sumergido en un mar de poca profundidad, conformando la compleja cuenca sedimentaria comprendida entre el escudo de la Guyana y la cordillera Central emergida; esta área dio origen a las rocas de la actual cordillera Oriental, plegadas y falladas por efecto de la orogenia andina. En los Llanos Orientales predominan suelos ácidos, poco fértiles, clasificados

taxonómicamente como Oxisoles, con sistemas de producción de riego y secano (Fedearroz, 2000).

Análisis de la fertilidad de suelos de la zona arrocerá de Meta y Tolima

Las 16 fincas seleccionadas para el estudio fueron tomadas de cuatro subregiones, dos pertenecientes a la región central, la zona del norte de Tolima (municipios de Lérida y Armero) y la zona sur de Tolima correspondiente a los municipios de Saldaña y Purificación (tabla 2.2a). De la zona de los Llanos Orientales se tomaron dos sistemas contrastantes de siembra: como fueron el sistema secano, que depende del agua lluvia para su mantenimiento y el sistema inundado que depende del agua proveniente de un sistema de riego. Las fincas estaban localizadas en los municipios de Villavicencio, Castilla la Nueva y Acacías (tabla 2.2b). Típicamente el muestreo correspondió a la toma de quince muestras de suelo rizosférico (figura 2.1), que fueron divididas en tres submuestras, para así obtener tres muestras compuestas. Las muestras fueron tomadas en puntos diferentes realizando un desplazamiento en zig-zag, donde cada punto estaba separado entre 15-25 metros dependiendo del tamaño y topografía del terreno (figura 2.1). Dichas muestras fueron almacenadas y refrigeradas en neveras de icopor y transportadas al Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia, donde fueron debidamente procesadas y almacenadas de acuerdo con el uso de la muestra (4 °C para el análisis de microorganismos cultivables y -20 °C para el análisis de DNA y actividad enzimática del suelo).

Las características generales y de fertilidad de suelos, como textura, humedad, culti-variedad, fecha y densidad de siembra, área sembrada y producción fueron registradas en las tablas 2.2a y 2.2b. Las fincas muestreadas fueron contrastantes en su fertilidad y producción. Por ejemplo, el pH osciló entre 4,5 y 6,8, y la MO presentó valores que van desde 2,0 % hasta 5,8 %. Incluso la tenencia de la tierra reveló una diferencia fundamental en relación con la situación socioeconómica de las dos regiones, siendo principalmente propiedad privada en la región de Tolima, mientras que en Meta es básicamente en arriendo, lo cual de seguro tiene implicaciones en el manejo agronómico de las fincas.

Para el segundo año, el PCA presenta un comportamiento similar al del primer año (explicando en un 70 % la variabilidad de los datos). Las diferencias encontradas podrían estar asociadas a los cambios en el manejo de las fincas y al régimen de lluvia durante el segundo año (figura 2.2). En este análisis se pueden diferenciar tres grupos: las fincas de Tolima sur, que se agruparon nuevamente por la presencia de calcio, la CIC y magnesio, las de Tolima norte que se agruparon por el azufre, manganeso y nitrógeno total y las fincas del Meta que se agruparon de una forma mas compacta en comparación al primer año.

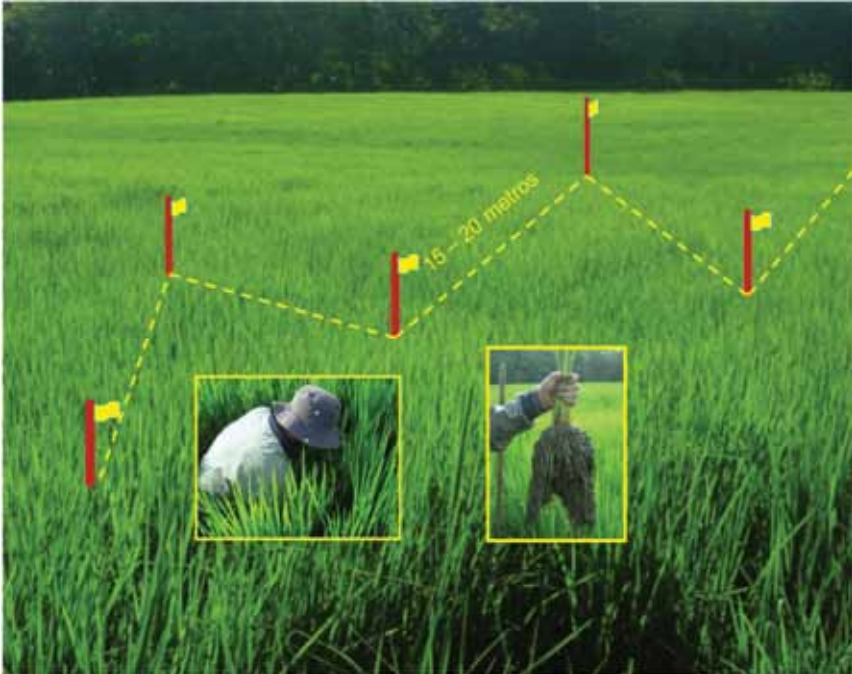


Figura 2.1 Representación del patrón de los puntos de muestreo en cada una de las fincas evaluadas en este trabajo. Los recuadros señalan cómo se llevó a cabo la toma de muestras de suelo rizosférico en cada punto analizado.

Fuente: finca del norte de Tolima, fotos Daniel Uribe-Vélez

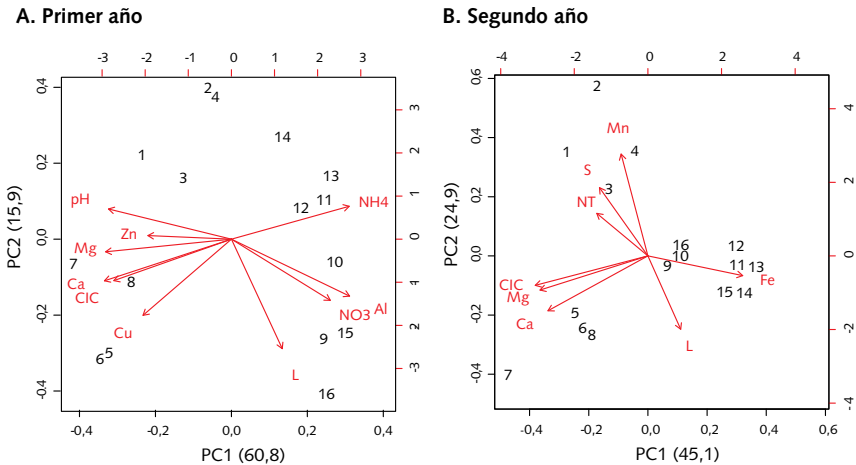


Figura 2.2 Análisis de componentes principales (PCA) entre parámetros físicos y químicos, y 16 fincas arroceras muestreadas para el primero (A) y segundo (B) año de muestreo. Tolima norte, fincas 1-4; Tolima sur, fincas 5-8. Meta, con sistema de cultivo inundado, fincas 11-14; Meta, con sistema de cultivo seco, fincas 9, 10, 15 y 16.

Fuente: autores

Tabla 2.2a Características generales de las ocho fincas de Tolima muestreadas durante dos años en este estudio.									
Característica/ Cultivo	Año	Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca 4	Finca 5	Finca 6	Finca 7	Finca 8
Nombre finca	1/2	El Puente	Carmelita	Culebras	San José	Florida	Santa Helena	Rancho Quemado	Finca 8
Geoposición	1/2	4°56'002"N/ 74°53'3,86"W	4°49'20"N/ 74°55'6,57"W	4°54'6,09"N/ 74°53'3,79"W	4°48'0,29"N/ 74°59'1,70"W	3°55'51,22"N/ 75°0'0"W	3°52'21"N/ 74°58'53"W	3°54'37"N/ 75°55'32"W	3°53'38"N/ 74°59'47"W
Fecha de muestreo	1	07 julio/08	07 julio/08	08 julio/08	08 julio/08	21 julio/08	21 julio/08	22 julio/08	22 julio/08
Sistema de riego	2	26 Oct./09	26 Oct./09	26 Oct./09	26 Oct./09	5 Oct./09	5 Oct./09	5 Oct./09	5 Oct./09
Tenencia tierra	1	Inundación	Inundación	Inundación ²	Inundación	Inundación	Inundación ²	Inundación	Inundación
Municipio	1/2	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio	Propio
Fecha de siembra	1/2	Armero	Lérida	Lérida	Lérida	Saldaña	Purificación	Saldaña	Saldaña
Fecha de siembra	1	20 abril/08	19 abril/08	7 abril/08	7 abril/08	27 abril/08	28 abril/08	29 abril/08	13 abril/08
Textura	2	06 julio/09	12 agosto/09	Descanso	1 agosto/09	ND	Descanso	23 junio/09	23 junio/09
Humedad	1/2	Far A ⁴	FA	FA	FA	FAr	FAr	FAr	FAr
pH	1	53,2	ND ¹	45,6	36,1	47,4	53,7	32,7	52,2
MO ³ (%)	2	47,1	42,3	43,7	32,0	57,9	36,1	37,1	49,9
MO ³ (%)	1	6,1	5,7	5,5	5,5	5,9	6,3	6,8	5,9
MO ³ (%)	2	5,6	5,8	5,7	5,8	5,8	6,3	5,9	6,3
MO ³ (%)	1	3,2	2,9	5,4	2,7	3,0	2,2	2,5	2,2
MO ³ (%)	2	5,8	4,2	4,6	3,1	3,9	3,1	3,6	2,5
Variedad	1	Fedearroz 60	Fedearroz 60	Fedearroz 60	Fedearroz 60	Fedearroz 60	Fedearroz 60	Fedearroz 60	Fedearroz 60
Densidad de siembra	2	Colombia 21	Fedearroz 60	Descanso	Fedearroz 60	Fedearroz 275	Descanso	Fedearroz 275	Fedearroz 60
Área sembrada	1	180 kg /ha	166 kg /ha	ND	140 kg /ha	200 kg /ha	200 kg /ha	150 kg /ha	150 kg /ha
Producción kg/ha	2	219 kg/ha	210 kg/ha	ND	225 kg/ha	ND	Descanso	180 kg/ha	200 kg/ha
	1	8,0 ha	9,0 ha	6,5 ha	12,0 ha	1,2 ha	3,0 ha	4,5 ha	13,0 ha.
	2	10,0 ha	9,0 ha	11,0 ha	14,0 ha	1,5 ha	3,0 ha	9,0 ha	13,0 ha
	1	9000,0 kg/ha	9687,0 kg/ha	6875,0 kg/ha	8785,0 kg/ha	6437,5 kg/ha	8125,0 kg/ha	9000,0 kg/ha	9125,0 kg/ha
	2	5269,0 kg/ha	ND	Descanso	6250,0 kg/ha	7187,5 kg/ha	Descanso	4375,0 kg/ha	6250,0 kg/ha

¹ND: No determinado.; ²Cultivos que para el segundo año de muestreo se encontraban en descanso; ³Materia orgánica.; ⁴F: franco, Ar: arcilla, A: arena.

Tabla 2.2b Características generales de las ocho fincas de Meta muestreadas durante dos años en este estudio.

Característica/ Cultivo	Año	Finca 9	Finca 10	Finca 11	Finca 12	Finca 13	Finca 14	Finca 15	Finca 16
Nombre finca	1/2	Jamaica	La Isla	Las doce	Capachos	La Porfia ¹	La providencia	Paramaribo	Santa Rosita
Geoposición	1/2	3°59'9,05"N/ 73°13'56,6"W	3°59'9,05"N/ 73°13'56,6"W	3°44'8,11"N/ 73°26'15,7"W	3°48'0,99"N/ 73°29'19,5"W	3°45'47,66"N/ 73°25'25,86"W	4°04'0,39"N/ 73°9'3,12"W	4°01'8,61"N/ 73°28'7,06"W	4°02'2,60"N/ 73°29'58"W
Fecha de muestreo	1	12 Ag./08	12 Ag./08	13 Ag./08	13 Ag./08	13 Ag./08	14 Ag./08	14 Ag./08	14 Ag./08
	2	2 Jul./09	2 Jul./09	1 Jul./09	1 Jul./09	1 Jul./09	2 Jul./09	3 Jul./09	3 Jul./09
Sistema de riego	1/2	Secano	Secano	Inundado	Inundado ²	Inundado	Inundado ²	Secano ²	Secano
Tenencia tierra		Arriendo	Arriendo	Arriendo	Propio	Arriendo	Arriendo	Arriendo	Arriendo
Municipio	1	Villavicencio	Villavicencio	Castilla La Nueva -	Castilla La Nueva -	Acacias	Villavicencio	Villavicencio	Villavicencio
Fecha de siembra	1	7 mayo/08	11 mayo/08	8 abril/08	12 abril/08	15 abril/08	8 febrero/08	8 abril/08	16 abril/08
	2	6 mayo 09	15 mayo/09	25 mayo/09	Descanso	25 marzo/09	Descanso	Descanso	14 mayo
Textura	1	FAR ⁵	F	FAR	FAR	F	F	F	F
	2	FAR L	FAR	FAR	FAR A	FAR	F	FL	FAR
Humedad (%)	1	37,0	40,0	52,3	62,0	72,3	33,1	31,4	36,1
	2	44,7	51,5	54,0	55,5	44,3	42,0	76,7	50,7
pH	1	4,9	4,8	5,4	5,3	5,2	5,7	4,6	4,5
	2	5,6	5,2	5,5	5,5	5,5	5,7	5,3	5,2
MO³ (%)	1	2,7	2,8	2,7	2,7	3,3	2,0	3,2	2,7
	2	2,9	3,3	2,9	3,0	2,1	2,7	2,8	3,4

continúa

Tabla 2.2b Características generales de las ocho fincas de Meta muestreadas durante dos años en este estudio (continuación).

Característica/ Cultivo	Año	Finca 9	Finca 10	Finca 11	Finca 12	Finca 13	Finca 14	Finca 15	Finca 16
Nombre finca	1/2	Jamaica	La isla	Las doce	Capachos	La Porfía ¹	La providencia	Paramaribo	Santa Rosita
Variiedad	1	Fedearroz 369	Fortaleza	Fortaleza	Fedearroz 369	Fedearroz 369	Fedearroz 369	Fedearroz 369	Fedearroz 369
	2	Fedearroz 174	Fedearroz 174	Fortaleza	Descanso	Fedearroz 369	Descanso	Descanso	Im- proarroz15-50
Área sembrada	1	19 ha	15 ha	12 ha	10 ha	ND ⁴	20,0 ha	12,0 ha	18,0 ha
	2	8 ha	11 ha	12 ha	Descanso	10,0 ha	Descanso	Descanso	3,5 ha
Producción	1	5938 kg/ha	4688 kg/ha	5300 kg/ha	6200 kg/ha	6700 kg/ha	5625 kg/ha	5687 kg/ha	5500 kg/ha
	2	6875 kg/ha	6812 kg/ha	4935 kg/ha	Descanso	5937 kg/ha	Descanso	Descanso	5937 kg/ha

¹La finca 13 no pudo ser muestreada en el año 2 por encontrarse en extinción de dominio; por esa razón fue remplazada por la finca Corrosal de la vereda San Lorenzo, con las siguientes coordenadas 3°46'72.1"N/73°27'31.4"W.

² Cultivos que para el segundo año de muestreo se encontraban en descanso; ³Materia orgánica; ⁴ND: No determinado; ⁵ F: franco, Ar: arcilla, A: arena.

Para realizar una comparación entre fincas y tiempos de muestreo se realizó un análisis de componentes principales (PCA) entre parámetros físicos y químicos y las 16 fincas muestreadas (figura 2.2).

Para el primer año, el PCA explica en un 76,9 % la variabilidad de los datos. Las fincas analizadas fueron separadas en cuatro cuadrantes, de tal manera que coincidió con la zona de muestreo. Las fincas de Tolima (fincas 1-8) fueron separadas de las de Meta (9-16). Incluso, las fincas de Tolima norte (1-4) fueron separadas de las de Tolima sur (5-8). Igualmente, las fincas de Meta se separaron de acuerdo con el sistema de cultivo, particularmente en respuesta al estado de oxidación del nitrógeno. Los cultivos inundados (11-14) se agruparon con el amonio y las fincas con cultivo de arroz seco (9, 10, 15 y 16) con el nitrato y el aluminio. Por otra parte, las fincas de Tolima sur (5-8) se correlacionaron con la presencia de cationes y la CIC, mientras que las fincas de Tolima norte parecen estar más influenciadas por el pH y el contenido de Zn en el suelo.

Fuente: autores

Si bien esta agrupación por cuadrantes facilita la comprensión del análisis, no necesariamente todas las fincas se agrupan claramente con la zona de donde provienen, lo que sugiere realizar un análisis más específico por cada zona y finca para entender el comportamiento de estos parámetros de forma particular.

Para entender el efecto de las variables físicas y químicas medidas por zona muestreada, se realizó un análisis comparando las subregiones de las dos grandes regiones productoras. Se encontró que las diferencias entre los suelos de las zonas arroceras de Meta y Tolima obedecen al sistema de producción de cultivo (inundado o seco), el origen parental de los suelos y las prácticas agrícolas llevadas a cabo en cada zona.

Análisis de fertilidad del suelo de las fincas arroceras de Meta

En el departamento de Meta se pueden diferenciar dos sistemas de cultivo del arroz: inundado y seco. En los cultivos inundados el agua de riego es provista por intervención humana, mientras el cultivo seco es alimentado por lluvias sin la acumulación de agua superficial (Khush, 1997). La película de agua en los cultivos inundados controla las malezas, regula el microclima y genera ambientes químicos y microbiológicos favorables para el desarrollo de las plantas. Los cultivos secos presentan menor agua intersticial; el hierro y el fósforo son menos solubles; adicionalmente el nitrógeno disponible está bajo la forma de nitrato (Ponnamperuma, 1975).

Los bajos rendimientos de los cultivos secos con respecto a los inundados están asociados fundamentalmente a la distribución y retención de humedad en el suelo. Por otra parte, las diferencias entre las zonas de cultivo de Tolima y Meta están determinadas en buena medida por la condición ambiental, aspecto en el que la zona arroceras de Tolima tiene una mejor oferta que la zona de los Llanos Orientales; así mismo, la zona de los Llanos presenta una baja fertilidad de sus suelos y poca disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo, silicio, además de toxicidad por manganeso y aluminio típica de los suelos ácidos (Ponnamperuma, 1975).

La tabla 2.3 muestra el análisis estadístico de las cuatro fincas objeto de estudio por cada sistema de cultivo en el departamento de Meta durante los dos años de muestreo. Este análisis se realizó con el objeto de identificar las variables que diferenciaron significativamente los dos sistemas de cultivo. Los suelos de Meta pertenecen al orden de los Oxisoles con pH ácido, altos contenidos de Al, Fe y Mn, bajas concentraciones de P, K, Ca y Mg, parámetros atribuibles a la pobreza de los materiales parentales y alto grado de intemperización (Malagón, 1995). Los análisis físicos y químicos indican que los suelos analizados son de baja fertilidad (CIC menor a 10 meq/100 g), presentan pH ácido, con exceso de Fe y Mn, baja disponibilidad de K y muy baja disponibilidad de Ca y Mg.

Para el primer año se encontraron diferencias significativas entre cultivos inundados y secanos en parámetros como el pH, Fe y NO_3^- ($p \leq 0,05$). Otros parámetros como Al, P, Zn, NT, NH_4^+ y porcentaje de humedad presentaron diferencias a un valor de $p \leq 0,1$. Ambos sistemas de cultivo presentaron pH ácido, el sistema seco pH 4,7, mientras que las fincas del sistema inundado pH 5,4, lo cual generó aumento en la disponibilidad de nutrientes. Los cultivos inundados se caracterizaron por presentar valores superiores a los cultivos secos para P, Fe, NH_4^+ y porcentaje de humedad, mientras que los cultivos secos revelaron valores superiores que los inundados para Mg, Al, Zn, NT y NO_3 (tabla 2.3).

Gran parte de las diferencias encontradas en los cultivos inundados y secos podrían obedecer a la columna de agua que mantienen los cultivos inundados. Esta columna de agua aumenta el pH, las condiciones reductoras y la solubilidad de diversos elementos como el fósforo (Liesack *et al.*, 2000; Ponnampertuma, 1975). Por otra parte, se ha reportado que bajo el sistema inundado decrece sustancialmente la actividad nociva del Al, pero se incrementa la de Fe (Fedearroz, 2000; Vargas, 2002). Las raíces de arroz cuando son cubiertas por Fe pueden afectar la toma de cationes metálicos como Zn, Cd, Cu y Pb (Ratering y Schnell, 2000). Igualmente, los contenidos de Fe suelen ser menos disponibles en suelos secos, siendo hasta el doble en suelos inundados con respecto a los secos (Ratering y Schnell, 2000). De la misma manera, la baja disponibilidad de P en el sistema seco (17,91 mg/kg), en comparación al inundado (42,15 mg/kg) está relacionado con su interacción con cationes como Al, Fe y Mn. La fertilización de fósforo es más importante en cultivos secos que inundados, porque el fósforo es poco disponible bajo condiciones aeróbicas y ácidas debido a la alta fijación del P en suelos secos (Ponnampertuma, 1975) y a que el P forma complejos fuertes con el Al.

En los cultivos secos, el promedio de amonio (27,78 mg/kg) fue mucho menor al de cultivos inundados (42,13 mg/kg). En suelos secos o en condiciones aeróbicas el N orgánico es transformado en nitratos; sin embargo, estos poseen la desventaja de ser aniones fácilmente lixiviados y sufren el proceso de desnitrificación que convierten los nitratos a formas no aprovechables por las plantas, perdiéndose en la atmósfera a través de gases que son nocivos para el ambiente (Jackson *et al.*, 2008). De forma similar, el amonio aplicado al suelo seco (no inundado) se oxida pronto a nitratos por la actividad de los microorganismos en el suelo, por lo que estará sujeto a las mismas pérdidas por lixiviación y desnitrificación (Frye, 1985). Por otra parte, ante las condiciones anaeróbicas inducidas por la inundación en un suelo arrocero, una capa de oxidación se forma en la superficie del suelo, y debajo de este, una zona de reducción. El amonio en la zona de oxidación se convierte en nitrato, y sufre las mismas pérdidas mencionadas arriba. Sin embargo, si este llega a la zona de reducción en la forma de amonio, se fija al suelo por el cambio de

Parámetros	Inundado						Secano					
	Primer año			Segundo año			Primer año			Segundo año		
	Media	ES	T	Media	ES	T	Media	ES	T	Media	ES	T
pH	5,40	0,11	a	5,55	0,05	a	4,70	0,09	b	5,33	0,09	a
% MO	2,70	0,26	ns	2,69	0,20	ns	2,86	0,11	ns	3,12	0,14	ns
Ca (meq/100 g)	1,58	0,20	ns	1,71	0,26	ns	1,77	0,19	ns	2,43	0,25	ns
Mg (meq/100 g)	0,37	0,06	cb	0,31	0,03	c	0,59	0,04	ab	0,68	0,08	a
K (meq/100 g)	0,28	0,02	ns	0,27	0,08	ns	0,30	0,06	ns	0,30	0,07	ns
Ca/Mg	4,39	0,44	ab	5,40	0,34	a	3,10	0,52	b	3,63	0,22	ab
Na (meq/100 g)	0,17	0,03	ns	0,12	0,00	ns	0,27	0,14	ns	0,14	0,05	ns
Al (meq/100 g)	0,87	0,30	ab	0,00	0,00	b	1,59	0,09	a	0,84	0,32	ab
CIC (meq/100 g)	7,69	1,43	ab	6,21	0,54	b	9,38	0,40	ab	10,11	0,60	a
P (mg/kg)	42,15	11,93	ns	54,40	18,46	ns	17,91	2,55	ns	31,89	16,00	ns
Cu (mg/kg)	2,15	0,49	ns	3,18	0,54	ns	2,76	0,34	ns	3,54	0,72	ns
Fe (mg/kg)	426,75	32,64	a	405,50	14,17	ab	219,50	23,36	c	264,25	53,99	cb
Mn (mg/kg)	44,58	5,37	b	53,53	7,08	b	43,60	7,47	b	95,38	11,69	a
Zn (mg/kg)	1,39	0,28	ns	1,51	0,16	ns	3,27	0,80	ns	3,44	0,81	ns
B (mg/kg)	0,26	0,01	ns	0,23	0,02	ns	0,24	0,02	ns	0,32	0,03	ns
% NT	0,17	0,02	a	0,12	0,01	b	0,22	0,01	a	0,19	0,00	a
NH ₄ ⁺ (mg/kg)	42,13	5,72	ns	26,08	5,72	ns	27,78	4,00	ns	25,18	1,89	ns
NO ₃ ⁻ (mg/kg)	9,09	3,26	b	4,29	0,94	b	29,45	3,84	a	5,35	0,27	b
% Humedad	54,93	8,34	ns	48,75	3,35	ns	36,13	1,78	ns	56,25	7,09	ns
% Ar	26,00	2,58	ns	28,50	1,71	ns	24,00	2,83	ns	29,00	2,16	ns
% L	35,00	0,82	ns	32,50	2,63	ns	41,50	3,30	ns	44,50	2,99	ns
% A	39,00	1,83	ns	39,00	2,89	ns	34,50	4,65	ns	26,50	2,50	ns

% MO (porcentaje de materia orgánica); Ca (Calcio); Mg (Magnesio); K (Potasio); Na (Sodio); Al (Acidez intercambiable); CIC (Capacidad de intercambio catiónico); P (Fósforo); Cu (Cobre); Fe (Hierro); Mn (Manganeso); Zn (Zinc); B (Boro); % NT (porcentaje de Nitrógeno total); NH₄⁺ (Amonio); NO₃⁻ (Nitrato); % Humedad (porcentaje de humedad); % Ar (porcentaje de arcillas); % L (porcentaje de limo); % A (porcentaje de arena); ns (no significativo); ES: error estándar; T: prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas según análisis de comparación múltiple de Tukey.

Fuente: autores

cationes y no es lixiviable; por tal razón, se queda en forma disponible para la absorción de las raíces. De acuerdo con lo anterior, bajo condiciones de inundación no se forman nitratos en el arroz, sino que ocurre la acumulación de N en formas amoniacales, que son consideradas más provechosas debido a que el arroz utiliza mejor el amonio que el nitrato.

Los cultivos secanos son menos eficientes en la asimilación del nitrógeno que los cultivos inundados (Shiga, 1975). Esto obedece a la activa nitrificación e inmovilización del fertilizante nitrogenado, y por eso se recomienda el empleo de fertilizantes nitrogenados con inhibidores de nitrificación, al igual que fertilizantes de liberación lenta, fertilizantes orgánicos o aplicaciones divididas del fertilizante (Shiga, 1975).

El valor promedio de K en los cultivos de Meta fue de 0,29 meq/100 g (este valor es un nivel ideal); sin embargo, su disponibilidad depende de la concentración de otros cationes. En condiciones anaeróbicas causadas por la inundación, el K se desplaza de los sitios de intercambio a la solución del suelo; esto se debe al intercambio de K por Mn y Fe de la fase de intercambio. Este proceso incrementa la concentración de K en la solución del agua y la difusión hacia las raíces; no obstante, aumenta el riesgo de pérdida por lixiviación, especialmente en suelos de textura gruesa (FAr y F) como los muestreados en este estudio. Igualmente, la necesidad de fertilización con K en dosis altas se explica por los altos requerimientos nutricionales del arroz, por la alta movilidad del K en el suelo y, por lo tanto mayores pérdidas por lavado. Además, existe la necesidad de incrementar la dosis de K proporcionalmente a la de N, especialmente con el objeto de hacer un adecuado manejo de problemas fitosanitarios (por ejemplo, *Piricularia oryzae*) y de volcamiento. Por otra parte, debe considerarse que alrededor de un 80% del K absorbido por la planta se encuentra en el tamo y que, al quemarlo o al utilizarlo como forraje para el ganado en estabulación, se aumenta la exportación de K del suelo y su empobrecimiento, junto con otros elementos como Ca y Mg (Perdomo, 1983).

Para las fincas en sistema seco el valor promedio de Ca (1,77 meq/100 g) y Mg (0,59 meq/100 g), fue similar a las inundadas (1,58 meq/100 g de Ca y 0,37 meq/100 g de Mg), datos que son bajos. La relación de Ca/Mg indica que existen deficiencias tanto de Ca como de Mg, lo cual puede estar asociado a las pérdidas por lavados de estos nutrientes en este tipo de suelos, los cuales en su proceso de formación pueden perder estos nutrientes debido a altas precipitaciones. Por otra parte, la inundación incrementa el pH, lo cual puede disminuir la disponibilidad de Zn y de Cu (tabla 2.3). En este trabajo, el análisis de correlación entre producción y parámetros físicos y químicos indicó una estrecha relación entre el rendimiento y la disponibilidad de micronutrientes como Cu, B y Zn. En Oxisoles se ha encontrado que las plantas de arroz responden a la aplicación de micronutrientes como Cu y Zn

aumentando la biomasa (Fageria *et al.*, 2008). Por esta razón, la fertilización con alguno de los elementos menores como Zn, Cu y B es una práctica que se viene realizando en la zona para corregir deficiencias del suelo o para mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas, especialmente en el proceso de formación y llenado de los granos de arroz (Sánchez y Owen, 1984).

En el segundo año de muestreo no todas las fincas estaban sembradas, las fincas 12 y 14 se encontraban en descanso y la finca 15 en barbecho o en descanso prolongado. Esto explica en parte las diferencias entre el primero y segundo año de muestreo. De las 21 variables físicas y químicas evaluadas, la CIC, Mn, Mg y NT difirieron entre manejos de cultivo ($p \leq 0,05$). Los cultivos secanos con respecto a los cultivos inundados se caracterizaron por presentar mayor CIC, concentración de Mn, NT y Mg. Tanto las fincas en descanso como las inundadas y secanas presentaron un comportamiento muy similar, que podría obedecer a una condición generalizada de inundación por el extenso período de lluvia en el segundo año de muestreo (julio de 2009). Esto explicaría igualmente el aumento de pH para los cultivos de secano en relación con el primer año y el aumento de la solubilidad para elementos como Mg, Mn e indirectamente la CIC, y además, que la forma predominante del nitrógeno mineral fuera el amonio. Igualmente, el tiempo de descanso de los suelos no fue suficiente para identificar en porcentajes de MO, pero sí del nitrógeno orgánico. Además, se encuentra que las características físico-químicas del suelo son muy estables y no se ven rápidamente influidas por los cambios en el uso de suelo. El análisis de PCA entre las fincas de Meta separó la finca 15 de las fincas con sistema de cultivo secano, pero no mostró diferencias entre las fincas con sistema de cultivo inundado y las que se encontraban en descanso (resultados no mostrados).

Análisis de fertilidad del suelo de las fincas arroceras de Tolima

En la zona del norte de Tolima predominan los suelos del orden Alfisoles, cubiertos recientemente por lodos arenosos con altos contenidos de hierro y azufre, convirtiéndolos en salinos ácidos por la alta concentración de sulfatos (Fedearroz, 2000). Por otra parte, los suelos de Tolima sur son suelos ácidos a neutros, con alta CIC asociada con altas concentraciones de Ca, carbonatos y elementos menores como el cobre (Malagón, 1995). Las zonas de estudio de Tolima se diferenciaron entre sí por las concentraciones de Ca, Ca/Mg, Ca/K, (Ca+Mg)/K, CIC, Cu, limo y arcilla, siendo estos valores siempre más altos en los suelos de Tolima sur, mientras que los valores de Mn, B y S, que también contribuyeron a establecer diferencias entre las zonas, presentaron valores más altos en Tolima norte (tabla 2.4). Estas relaciones no cambiaron entre el primer y segundo año, lo cual indica que los parámetros físico-químicos son muy estables en el tiempo.

El análisis estadístico sugiere una uniformidad entre variables como % CO, K, P y % NT para las zonas muestreadas, que podría ser reflejo de una constante actividad agrícola donde se reducen los contenidos de MO y se mantienen constantes los macronutrientes asociados a la fertilización inorgánica. Sin embargo, se presentaron suelos con altos y bajos contenidos de N y P. Lo anterior resalta la importancia de seguir las recomendaciones del análisis físico-químico del suelo para lograr el mayor rendimiento potencial del cultivo.

La disponibilidad de los nutrimentos presenta gran variabilidad en los suelos bajo estudio, desde suelos muy deficientes a muy fértiles. En los micronutrimentos como Zn, Cu, B se manifiesta gran variabilidad con relación a su disponibilidad. Elementos como Fe y Mn muestran valores altos que son afectados por la cantidad de agua que se presente en el suelo. Igualmente, la capacidad de retención de humedad en un suelo está estrechamente relacionada con la textura. En suelos arenosos la retención de humedad es baja, mientras que en suelos arcillosos es alta (Montenegro-González, 2003). Con relación a la textura, los suelos están distribuidos de acuerdo con su contenido de arcilla (Ar); en suelos con alto contenido de Ar hay una alta retención de humedad y, por tanto, una buena disponibilidad de nutrientes, mientras los suelos con bajo contenido de Ar presentan una tendencia de baja fertilidad (tabla 2.4). Con respecto a la proporción de arena, se ve la tendencia de dos grupos, similar a la del contenido de Ar.

Al llevar a cabo el análisis de correlación se encuentra que el pH es inversamente proporcional a la MO ($r^2: -0,54$), al AI ($r^2: -0,68$) y al NT ($r^2: -0,68$), pero directamente proporcional al Ca ($r^2: 0,66$) y al Mg ($r^2: 0,61$). En el caso de la MO, esta es directamente proporcional al contenido de NT ($r^2: 0,81$) y a la AI ($r^2: 0,41$)

Esta información permite diferenciar los dos grupos de suelo bajo estudio en la zona de Tolima. Los análisis físico-químicos de Tolima sur indican que los suelos son de fertilidad media, ligeramente ácidos, con altos contenidos de materia orgánica y con altas concentraciones de Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn, mientras los suelos de Tolima norte son de fertilidad baja, moderadamente ácidos, con altos contenidos de materia orgánica y con niveles ideales de Ca, medios de Mg, K, Cu y con un exceso de Fe, Mn, Zn y S.

Tabla 2.4 Comparación de parámetros físico-químicos entre zonas de Tolima para primero y segundo año.

Parámetros	Tolima norte						Tolima sur					
	Primer año			Segundo año			Primer año			Segundo año		
	Media	ES	T	Media	ES	T	Media	ES	T	Media	ES	T
pH	5,70	0,14	ns	5,73	0,04	ns	6,23	0,21	ns	6,07	0,12	ns
% CO	2,07	0,37	ns	2,56	0,32	ns	1,56	0,12	ns	1,90	0,18	ns
% MO	3,56	0,63	ns	4,40	0,56	ns	2,48	0,18	ns	3,27	0,32	ns
Ca (meq/100 g)	5,29	1,05	b	5,12	0,64	b	14,65	1,44	a	14,20	1,16	a
Mg (meq/100 g)	2,04	0,55	ns	1,86	0,30	ns	3,31	0,59	ns	3,39	0,63	ns
K (meq/100 g)	0,26	0,03	ns	0,23	0,04	ns	0,37	0,06	ns	0,33	0,07	ns
Ca/Mg	2,71	0,17	b	2,81	0,15	b	4,61	0,42	a	4,43	0,49	a
Mg/K	7,68	1,33	ns	8,24	0,49	ns	8,94	0,79	ns	10,63	1,53	ns
Ca/K	20,45	2,61	b	23,05	1,61	b	41,62	6,30	a	45,79	5,33	a
Ca+Mg/K	28,12	3,86	c	31,29	1,97	cb	50,80	7,12	ba	56,42	6,50	a
Na (meq/100 g)	0,17	0,03	ns	0,18	0,01	ns	0,23	0,01	ns	0,21	0,02	ns
Al (meq/100 g)	0,00	0,00	ns	0,00	0,00	ns	0,00	0,00	ns	0,00	0,00	ns
CIC (meq/100 g)	12,33	1,74	c	13,68	1,58	cb	19,03	1,18	ba	20,13	1,52	a
P (mg/kg)	19,12	9,92	ns	13,68	4,42	ns	30,93	4,22	ns	29,68	3,44	ns
Cu (mg/kg)	2,81	0,82	ns	2,46	0,89	ns	5,36	0,56	ns	5,40	0,89	ns

continúa

Tabla 2.4 Comparación de parámetros físico-químicos entre zonas de Tolima para primero y segundo año (continuación).

Parámetros	Tolima norte						Tolima sur					
	Primer año			Segundo año			Primer año			Segundo año		
	Media	ES	T	Media	ES	T	Media	ES	T	Media	ES	T
Fe (mg/kg)	254,25	39,18	ns	170,25	34,47	ns	289,50	45,06	ns	169,75	39,16	ns
Mn (mg/kg)	166,38	50,62	ba	293,65	93,45	a	74,33	17,08	ba	37,63	7,11	b
Zn (mg/kg)	6,44	0,75	ns	4,88	0,38	ns	5,44	0,92	ns	3,70	0,51	ns
B (mg/kg)	0,34	0,04	ba	0,40	0,04	a	0,25	0,02	b	0,31	0,02	ba
% Ar	19,75	4,87	ns	18,00	3,11	ns	31,00	1,73	ns	31,00	1,41	ns
% L	18,25	1,11	b	22,50	5,06	ba	35,00	2,86	a	33,50	1,26	a
% A	62,00	5,69	a	59,50	5,68	a	33,75	3,66	b	35,50	1,71	b
% NT	0,20	0,03	ns	0,19	0,02	ns	0,14	0,01	ns	0,16	0,02	ns
NH ₄ ⁺ (mg/kg)	13,15	1,99	ns	13,77	6,16	ns	2,99	1,49	ns	21,70	7,22	ns
NO ₃ (mg/kg)	7,46	1,26	ns	8,09	2,11	ns	3,00	1,21	ns	16,79	7,56	ns
% Humedad	43,74	3,52	ns	41,18	3,22	ns	46,50	4,79	ns	45,25	5,31	ns
S (mg/kg)	ND	---	---	54,68	16,24	a	ND	---	---	10,80	2,53	b

% CO (porcentaje de Carbono); % MO (porcentaje de materia orgánica); Ca (Calcio); Mg (Magnesio); K (Potasio); Na (Sodio); Al (Acidez intercambiable); CIC (capacidad de intercambio catiónico); P (Fósforo); Cu (Cobre); Fe (Hierro); Mn (Manganeso); Zn (Zinc); B (Boro); % NT (porcentaje de Nitrógeno total); NH₄⁺ (Amonio); NO₃ (Nitrato); % Ar (porcentaje de arcillas); % L (porcentaje de limo); % A (porcentaje de arena); S (azufre); ND (no determinado); ns (no significativo); ES: error estándar; T: prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas según análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

Fuente: autores

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que:

1. Las zonas muestreadas en Meta y Tolima fueron diferenciadas por el material parental, lo cual se ve reflejado en las características físicas y químicas y el estatus nutricional del suelo en cada zona.
2. Los suelos de Tolima, de mayor fertilidad, presentan pH con valores neutros a alcalinos, con mayor concentración de nutrientes como el calcio, magnesio y fósforo, principalmente; sin embargo, con tendencia a disminuir sus contenidos de MO debido posiblemente a malas prácticas como el exceso de mecanización.
3. Los suelos para cultivo de arroz en Meta son suelos ácidos con altas concentraciones de Al, Fe y Mn, bajas concentraciones de Ca y Mg. Estos suelos fueron diferenciados por el sistema de cultivo, presentándose en cultivos bajo inundación valores más altos de pH y mayor concentración de Fe con respecto a los cultivos de arroz secanos. Igualmente, en los cultivos inundados la forma predominante del nitrógeno fue el amonio, mientras en los cultivos secanos predominaron los nitratos. Estas diferencias tienen implicaciones relevantes en la dinámica de los ciclos biogeoquímicos en términos de la disponibilidad de nutrientes y, por ende, en el favorecimiento de uno u otro subproceso de cada ciclo, lo que es importante tener en cuenta en el momento de la aplicación de un tipo de enmienda microbiológica.
4. La zona de Tolima pudo ser diferenciada en dos subregiones, posiblemente producto del material parental. Los suelos de Tolima sur presentaron fertilidad media, suelos ligeramente ácidos, altos contenidos de MO y altas concentraciones de Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn, mientras que los suelos de Tolima norte son de fertilidad baja, moderadamente ácidos, con altos contenidos de MO y niveles ideales de Ca, medios de Mg, K, Cu y un exceso de Fe, Mn, Zn y S. Las zonas de Tolima también se diferencian entre sí por las concentraciones de Ca, Ca/Mg, Ca/K, (Ca+Mg)/K, C/C, Cu, limo y arcilla, siendo estos valores siempre más altos en los suelos de Tolima sur. La aparente uniformidad en términos estadísticos entre variables como % CO, K, P y % NT para las cuatro zonas muestreadas podría ser efecto de la constante actividad agrícola donde se reducen los contenidos de MO y se mantienen constantes los macronutrientes asociados a la fertilización inorgánica.

Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, entidades que cofinanciaron este trabajo a través del contrato 2007B6423 161-

1020/2007. Javier Vanegas agradece la financiación de “Apoyo a doctorados nacionales” de Colciencias-Icetex-Sena.

Referencias

- Castilla, L. A. (2006). Fertilización bio-orgánica en el cultivo del arroz. En *Biofertilización: Alternativa viable para la nutrición vegetal* (1.ª ed.). Capítulo Tolima (pp. 151-163). Ibagué, Tolima: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo.
- Cortés, A. y Malagón, D. (1982). *Los levantamientos agrológicos y sus múltiples aplicaciones*. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Santafé de Bogotá: Colombiana de impresos Ltda.
- Fageria, N. K., Filho, B. M. P., & Moreira, A. (2008). Screening Upland Rice Genotypes for Manganese-use Efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(19-20), 2873-2882.
- Fedearroz. (2000). *Manejo y conservación de suelos para la producción de arroz en Colombia* (1.ª ed.). Bogotá: Fedearroz.
- Frye, A. (1985). Diagnóstico químico de la fertilidad de suelos arroceros. Curso Nacional de Arroz. Ibagué: Federación Nacional de Arroceros.
- Frye, A. (2001). Análisis químico de suelos y diagnóstico de su fertilidad. *Temas de fertilidad de suelos*. Ibagué: Universidad del Tolima.
- Jackson, L. E., Burger, M., & Cavagnaro, T. R. (2008). Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 341-363.
- Khush, G. S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*, 35, 25-34.
- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 625-645.
- Malagón, C. (1995). Suelos de Colombia: origen, evolución, clasificación, distribución y uso. Santafé de Bogotá: Subdirección de Agrología, Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC).
- Montenegro-González, H. (2003). Propiedades físicas de los suelos en relación con la fertilidad. En M. del P. Triana, R. Lara-Silva, M. I. Gómez y G. Peñaloza (Eds.). *Manejo integral de la fertilidad del suelo* (pp. 1-21). Bogotá, D.C.: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo.
- Perdomo, M. A. (1983). *Los macronutrientes en los nutrimentos de la planta del arroz*. Guía de estudio, Serie 045R-09 CIAT, Cali.
- Ponnamperuma, F. N. (1975). Growth limiting factors of aerobic soils. In *Major Research in Upland Rice*. Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute.
- Prassana, R., Nain, L., Pandey, A. K., & Nayak, S. (2010). Exploring the ecological significance of microbial diversity and networking in the rice ecosystem.

- In P. Dion (Ed.). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Quintero, L. E., Acevedo, X. y Salazar, M. (2004). Costos de producción de arroz en Colombia. En Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio de Agrocadenas. *Documento de Trabajo* 41.
- Ratering, S., & Schnell, S. (2000). Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochemistry*, 48, 341-365.
- Sánchez, L. F., y Owen, E. J. (1984). Fertilización de cultivos anuales en los Llanos Orientales. *Manual de Asistencia Técnica* 27. Tibaitatá.
- Shiga, H. (1975). Mineral microbial transformations in upland rice soil. IRI 1975. Growth limiting factors of aerobic soils. In *Major Research in Upland Rice* (pp. 217-238). Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute.
- Vargas, S. (2002). *Fertilización con cuatro niveles de nitrógeno, fósforo y potasio, y curvas de absorción de la variedad Fedearroz 50, en condiciones de secano favorecido*. Bogotá: Departamento técnico y de control, Corporación Arrocera Nacional.

Abundancia de diazótrofos, actividad nitrogenasa y proteasa en cultivos arroceros de los departamentos de Tolima y Meta

Javier Vanegas¹, Catalina Camelo², Janeth Rodríguez¹,
Luz Marina Melgarejo², Daniel Uribe-Vélez^{1,*}

1 Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia

2 Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia

• duribev@unal.edu.co

El nitrógeno (N) es el nutriente más limitante para la producción de arroz en el mundo, y afecta de manera significativa los costos de producción (Quintero *et al.*, 2004). Una de las razones asociadas a la limitación de la fertilización nitrogenada es la baja eficiencia en la asimilación de fertilizantes inorgánicos nitrogenados, la cual fluctúa entre el 34 y 40 %, dejando entre un 60-66 % de este nutriente libre en el ambiente (Kennedy *et al.*, 2004). Esta baja asimilación del N genera problemas ambientales como la eutroficación de aguas superficiales y subterráneas y la producción de gases de invernadero como N₂O, NO y NH₃ (Jackson *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2004).

El suelo es un ecosistema altamente complejo conformado por agua, aire, partículas orgánicas e inorgánicas y una gran diversidad de organismos. La constante interacción entre estos organismos y las variables ambientales tiene grandes implicaciones en la transformación de nutrientes, lo cual es particularmente importante en los ecosistemas agrícolas (Kennedy y Smith, 1995). El cultivo de arroz se caracteriza por ser un agro-ecosistema que alberga una amplia diversidad microbiana de grupos funcionales, debido a la zonación generada por la columna de agua (Liesack *et al.*, 2000). Esta zonación crea micro y macro hábitat caracterizados por diferentes potenciales redox, propiedades físicas, estatus nutricional y de luz, que permiten la actividad de un amplio grupo de microorganismos (Choudhury y Kennedy, 2004; Roger y Watanabe, 1986). En especial, los microorganismos fijadores de N (diazótrofos) aerobios, anaerobios, microaerófilos, heterótrofos, fotótrofos, de vida libre y simbióticos (Choudhury y Kennedy, 2004). Estos diazótrofos

en cultivos inundados de arroz sin fertilización agrícola intensiva podrían sostener la producción agrícola y llegar a contribuir entre 15 y 50 kg de N por ha (Choudhury y Kennedy, 2004; Roger y Watanabe, 1986; Ueda *et al.*, 1995). El estudio de los diazótrofos y los mineralizadores de N son esenciales para complementar o reemplazar la fertilización química del N en cultivos de arroz (Dick y Tabatabai, 1993; Kennedy *et al.*, 2004; Ladd y Jackson, 1982) y desarrollar un manejo sostenible (Kennedy y Smith, 1995).

El objetivo de este trabajo fue comparar la abundancia de diazótrofos, la actividad nitrogenasa y proteasa involucrados en procesos de la fijación y mineralización del N en 16 fincas arroceras, distribuidas en cuatro zonas arroceras del país (dos del departamento de Tolima y dos del departamento de Meta).

Estimación de la abundancia de diazótrofos en cuatro zonas productoras de arroz en los departamentos de Tolima y Meta

La abundancia de diazótrofos se estimó por recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) en el medio de cultivo libre de nitrógeno (NFB) de Rennie (1981) modificado. Este medio está compuesto por ácido málico (5 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,5 g.L⁻¹), NaCl (0,1 g.L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (0,2 g.L⁻¹), CaCl₂·2H₂O (0,02 g.L⁻¹), KOH (2 g.L⁻¹), glucosa (8 g.L⁻¹), manitol (8 g.L⁻¹), azul de bromotimol (0,05 g.L⁻¹), 2 ml de una solución de micronutrientes (Para 200 ml: Na₂MoO₄·2H₂O 0,02 g, MnSO₄ 0,235 g, H₃BO₃ 0,280 g, CuSO₄·5H₂O 0,008 g, ZnSO₄·7H₂O 0,0024 g), 4 ml de EDTA-Fe (Na₂EDTA·2H₂O 0,8258 g y FeSO₄·7H₂O 0,556 g), 1 ml de vitaminas (biotina 0,1 g.L⁻¹ y piridoxina 0,2 g.L⁻¹), Agar (14 g.L⁻¹), se ajusta a pH 7; el manitol y la glucosa son esterilizados por aparte. Se usaron diluciones seriadas (hasta 10⁻⁶) a partir de 10 g de suelo rizosférico, los cuales fueron disueltos en 90 mL de solución estéril de NaCl al 0,85 % (p/v). Las diluciones seriadas fueron sembradas sobre superficie en medios de cultivo NFB, e incubadas a 30 °C durante 5 días. Cada muestra fue procesada por triplicado.

Para el primer año de estudio, los recuentos de diazótrofos no mostraron diferencias entre las dos zonas de Tolima; solo entre fincas. Los mayores recuentos se presentaron en la finca 8 (7,49 log de ufc.g⁻¹) y los menores valores en la finca 5 (6,75 log de ufc.g⁻¹) (figura 3.1). Al hacer un análisis de correlación entre los recuentos de microorganismos y los factores fisicoquímicos del suelo se encontró que estos recuentos correlacionaron con la disponibilidad de cationes (tabla 3.1). En Meta se encontraron diferencias significativas entre cultivos secanos (7,07 log de ufc.g⁻¹, en promedio) e inundados (7,34 log de ufc.g⁻¹, en promedio). La finca 12 presentó los mayores recuentos en el medio de cultivo NFB mientras la finca 15, los menores recuentos (figura 3.1). Al realizar un análisis de correlación con las características fisicoquímicas del suelo, los recuentos solo se correlacionaron positivamente con el porcentaje

de humedad. Se ha reportado que los conteos bacterianos son influidos por el contenido de agua (Maron *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2002), lo cual en otros estudios ha sido relacionado con una mayor disponibilidad de nutrientes y microhábitat por colonizar (Liesack *et al.*, 2000).

Para el segundo año, los cultivos de Tolima sur presentaron valores superiores a los registrados por Tolima norte, siendo la finca 7 la que evidenció los mayores recuentos (8,36 log de ufc.g⁻¹) (figura 3.1). Estos se correlacionaron con el pH, la disponibilidad de cationes, el P, Cu, B, la textura del suelo, S y Mn (tabla 3.1). En el departamento de Meta, en el segundo año de estudio, no se hallaron diferencias significativas entre los recuentos de los cultivos secos (7,41 log de ufc.g⁻¹) e inundados (7,42 log de ufc.g⁻¹), a pesar de las diferencias significativas entre fincas (figura 3.1). Estos recuentos se

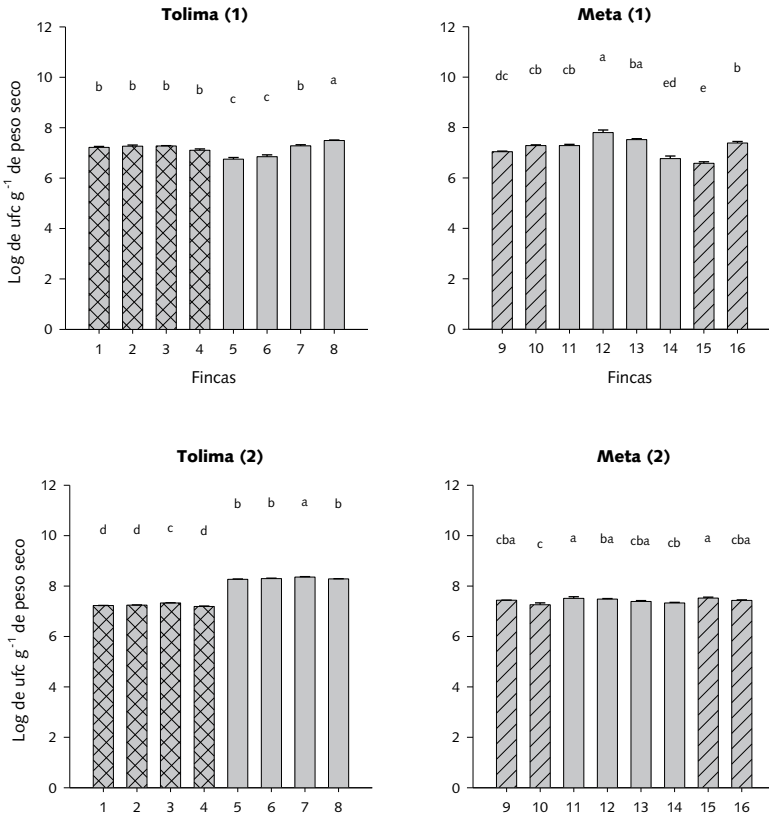


Figura 3.1 Recuentos en medio NFB expresado como logaritmo de UFC.g⁻¹ de peso seco para los departamentos de Tolima (Tolima norte, fincas 1-4. Tolima sur, fincas 5-8) y Meta (Meta inundado, fincas 11-14 y Meta seco, fincas 9, 10, 15 y 16) para el primero (1) y segundo (2) año. Las barras corresponden al promedio con su respectivo error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) por test de comparación de Tukey. Fuente: autores

correlacionaron positivamente con el amonio y el K, y negativamente con el Na (tabla 3.1).

Tabla 3.1 Variables fisicoquímicas evaluadas durante dos años de cultivo.									
Variables	Primer año				Segundo año				
	Tolima		Meta		Tolima			Meta	
	PROT	NFb	PROT	NFb	P.ARA	PROT	NFb	PROT	NFb
pH	-0,84a						0,72b		
Ca	-0,91a				0,65c		0,95a		
Mg	-0,74b						0,69b		
Ca/Mg	-0,66c						0,78b		
Mg/K	-0,61c				0,67c	-0,69c			
Ca/K	-0,75b	-0,68b			0,65c		0,84a		
(Ca+Mg)/K	-0,76b	-0,68c			0,68c	-0,64c	0,82a		
Na	-0,83a								-0,68b
CIC	-0,93a						0,79a		
P			0,66c				0,79a		
Cu			-0,78b		0,66c		0,70b	0,74b	
B	0,72b						-0,64c		
Arcilla	-0,83a						0,83a		
Limo	-0,84a						0,68b		
Arena	0,91a						-0,87a		
% H				0,77b				0,87a	
NH ₄ ⁺	0,71b		0,71b			-0,84a			0,64c
K									0,63c
NO ₃ ⁻	0,78b								
% NT	0,68c								
S					-0,62c		-0,71b		
Mn							-0,78b		
NFb					0,65c				

P.ARA: potencial de la actividad nitrogenasa evaluada mediante la prueba de reducción del acetileno al adicionar solución de azúcares; PROT: proteasa; NFb: recuentos en medio de crecimiento libre de N; a: $p \leq 0,001$; b: $p \leq 0,05$; c: $p \leq 0,010$. Los espacios en blanco indican que no se presentaron correlaciones significativas; CIC: Capacidad de intercambio catiónico; % H: porcentaje de humedad; % NT: porcentaje de nitrógeno orgánico.
Fuente: autores

Determinación de la actividad nitrogenasa y proteasa en suelos arroceros

Actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa del suelo fue determinada por la prueba de reducción de acetileno según lo descrito por Zuberer y Silver (1978). Para cada cultivo se tomaron 15 núcleos de suelo con una jeringa de 5 cm de largo y 1 cm de diámetro. Estos núcleos fueron depositados en frascos ámbar de 50 mL de volumen. Los frascos fueron sellados herméticamente y el 20 %

de la atmósfera del frasco fue remplazado con acetileno. Luego, fueron incubados durante 3 días a 30 °C. Para el segundo año, además de la actividad nitrogenasa, se determinó el potencial de la actividad nitrogenasa a un set de núcleos de suelo, entendido este potencial como la capacidad de expresar la actividad de la enzima si no hubiese limitación de energía para el proceso. En este contexto, a cada núcleo de suelo se le agregó 0,5 mL de una solución que contiene 8 g.L⁻¹ de glucosa y 8 g.L⁻¹ de manitol; posteriormente, se retiró 1 mL de la atmósfera de los frascos y se analizó mediante un cromatógrafo de gases (Varian 6000 Instrument Group, USA), equipado con un detector de ionización de hidrógeno por flama (FID). Las condiciones de uso fueron: columna de 150 x 0,2 cm empacado con Porapak N 80/100, temperatura de la columna de 60 °C, temperatura del inyector 50 °C, temperatura del detector de 200 °C, el N y el H fueron transportados a un flujo de 25 mL.min⁻¹ y el rango del flujo de aire fue de 300 mL min⁻¹ (Lozano, 1998).

Para el primer año no se detectó actividad nitrogenasa en ninguna de las 16 fincas muestreadas. Esta situación puede estar relacionada con la fertilización en los cultivos de arroz, ya que se ha reportado que altas concentraciones de nitrógeno inhiben la actividad de esta enzima (Rao, 1976; Shrestha y Maskey, 2005). En este contexto, es reportado que en zonas como Tolima y Meta se aplican dosis hasta de 200 y 105 kg de N.ha⁻¹, respectivamente, valores que están por encima de los rangos en los cuales se ha reportado que la fertilización nitrogenada puede tener efecto negativo sobre la actividad de la nitrogenasa. En este sentido, Shrestha y Maskey (2005) señalaron que la fertilización entre 20 a 100 kg de N.ha⁻¹ reduce la fijación de N entre un 75 a 85 %, mientras que Rao (1976) y Mårtensson *et al.* (2009) indicaron que la aplicación de bajos niveles de N (40 kg N ha⁻¹), mejora la actividad de esta enzima. Estos resultados, aunque parecieran un poco contradictorios, claramente indican que la actividad de esta enzima en el suelo va a depender, entre otros factores, del tipo de suelo, el genotipo de la planta y el manejo del cultivo, como lo sugieren Rao *et al.* (1998).

La sostenibilidad del cultivo del arroz va a depender de la implementación de prácticas de cultivo que conlleven a la optimización en el manejo de la fertilización. Estas prácticas deben involucrar estrategias de uso de microorganismos fijadores de N y la aplicación racional de fertilizantes nitrogenados a tasas que permitan la nutrición del cultivo, sin generar pérdidas al ambiente ni desperdicio del recurso. En cuanto a la aplicación de diazótrofos, las estrategias deben estar dirigidas al manejo del suelo, la selección de plantas que favorezcan la simbiosis e innovaciones biotecnológicas que permitan asegurar una relación planta microorganismo eficiente (Rao *et al.*, 1998). En este sentido, cabe mencionar los aportes de Charyulu y Rao (1981), quienes encontraron que la incorporación de materia orgánica, además de estimular la fijación de N, disminuye los efectos inhibitorios de la fertilización nitrogenada.

Igualmente, entre cosechas, el uso de leguminosas de rápido crecimiento (*Sesbania* y *Crotalaria*) o de corta duración (Caupí) pueden acumular entre 40-60 kg de N ha por fijación de N (Ladha *et al.*, 1992).

Otras estrategias están dirigidas al empleo de cultivariedades que presenten una mejor asociación con diazotófos debido a la excreción de altas concentraciones de exudados rizosféricos (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Por otra parte, el empleo de diazotófos endófitos evidencia varias ventajas frente a los diazotófos rizosféricos, ya que los primeros son parcialmente afectados por las condiciones externas de fertilización de N (Reis y Döbereiner, 1998), además de estar en un ambiente con altas concentraciones de fuentes de carbono, condición que les facilita la fijación de N (Sturz *et al.*, 2000). Los microorganismos endófitos además poseen la ventaja de que promueven el crecimiento en arroz, como lo han demostrado algunos estudios con *Herbaspirillum seropedicae* (Elbeltagy *et al.*, 2001; Gyaneshwar *et al.*, 2002), *Pantoea agglomerans* (Verma *et al.*, 2001) y *Burkholderia spp* (Baldani *et al.*, 2000). Esta actividad se ha potenciado mediante la mezcla de endófitos (Govindarajan *et al.*, 2008). Otras estrategias para el manejo de inoculantes fijadores de nitrógeno en cultivos de arroz incluyen el uso de diazotófos que no sean inhibidos por las altas concentraciones de N (Colnaghi *et al.*, 1997), la inducción de para-nódulos en plantas de arroz para ser inoculados por *rizhobiaceas* (Senthilkumar *et al.*, 2009) o el empleo de cepas sobre-excretoras de N (Christiansen-Weniger y Vanderleyden, 1994).

Para el segundo año no se detectó actividad nitrogenasa en ninguna de las 16 fincas muestreadas. Por ello, se evaluó el potencial de la actividad nitrogenasa en las 16 fincas mediante la aplicación de una enmienda energética de glucosa-manitol (figura 3.2). Las fincas de Meta presentaron potencial actividad nitrogenasa con valores promedios superiores a los de las fincas de Tolima, destacándose las fincas 9, 10, 12 y 14 (figura 3.2). Merece destacar que no se encontraron diferencias, ni un patrón específico, en el potencial de la actividad nitrogenasa entre cultivos inundados y secanos, e incluso no se evidenciaron diferencias entre terrenos cultivados o en descanso. Esto sugiere que las diferencias encontradas entre Tolima y Meta no están relacionadas con las diferencias intrínsecas en el sistema de cultivo, toda vez que en Tolima no hay cultivos tipo seco. Por otra parte, es importante mencionar que si bien en Meta se evidenció un mayor potencial de actividad que en Tolima, estos valores son aun bajos con respecto a estudios similares realizados en otros cultivos de arroz (Chen *et al.*, 2009). Llama la atención la falta de diferencias entre ambos sistemas de cultivo (inundado y seco), ya que otros estudios han reportado que tanto la actividad nitrogenasa como el número de diazotófos es mayor en cultivos inundados que en secanos (Barraquío *et al.*, 1986) debido a la película de agua, la cual genera diferentes

microhábitat que permiten el establecimiento de una mayor diversidad de diazótrofos (Choudhury y Kennedy, 2004; Roger y Watanabe, 1986).

La identificación de actividad nitrogenasa durante el segundo año, debido a la aplicación de una enmienda energética, así como a la falta de actividad en el primer y segundo año sin fuentes de carbono, sugiere que a pesar de la inhibición de la nitrogenasa por efectos de la fertilización nitrogenada, la comunidad de diazótrofos sí está presente en los cultivos. Sin embargo, dicho grupo funcional no está activo, ya que además del aparente efecto inhibitorio del amonio presente en el suelo, este se encuentra bajo condiciones limitantes de fuentes de carbono, de tal forma que no puede suplir la alta demanda energética que implica fijar N (Martínez-Argudo *et al.*, 2005; Zuberer y Silver, 1978). Las limitaciones en fuentes de carbono son una condición típica en los cultivos de arroz en el trópico, generada a expensas de la rápida mineralización de carbono orgánico en suelos en estas zonas (Rao *et al.*, 1998). En este sentido, la aplicación de enmiendas como melaza, la incorporación del tamo a suelos arroceros o la aplicación directa de materia orgánica estimulan la actividad nitrogenasa gracias al incremento de fuentes de carbono disponibles para la actividad microbiana (Thakuria *et al.*, 2009), además de la disminución de tensiones de oxígeno en el suelo debido al incremento en la respiración microbiana (Leganes *et al.*, 2001).

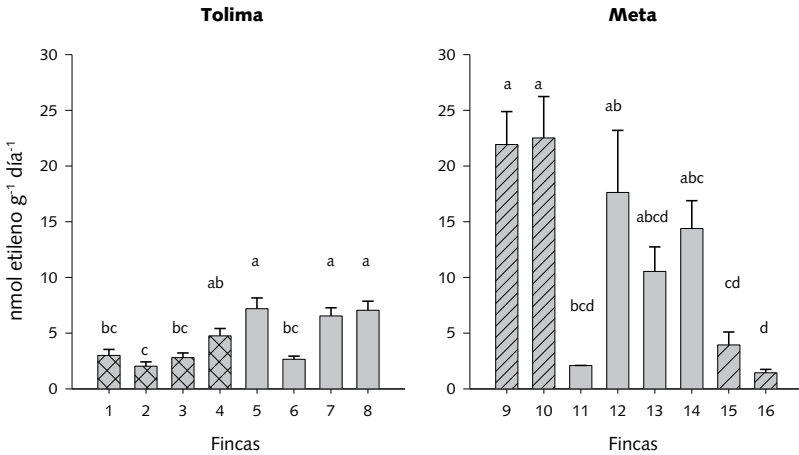


Figura 3.2 Potencial de la actividad nitrogenasa en nmoles de etileno g de peso seco de suelo⁻¹ día⁻¹ para los departamentos de Tolima (Tolima norte, fincas 1-4; Tolima sur, fincas 5-8) y Meta (Meta inundado, fincas 11-14 y Meta seco, fincas 9, 10, 15 y 16), para el segundo año. Las barras corresponden al promedio con su respectivo error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) por test de comparación de Tukey.

Fuente: autor

Las fincas de Tolima sur, con excepción de la finca 6 que se encontraba en descanso, presentaron mayor potencial de actividad nitrogenasa que las fincas de Tolima norte (figura 3.2). Tolima sur mostró actividad de 5,86 nmoles de etileno.g⁻¹.día⁻¹, en promedio, mientras que en Tolima norte el promedio fue de 3,15 nmoles de etileno.g⁻¹.día⁻¹. La actividad nitrogenasa se correlacionó con el recuento en medio nFb, S, Cu y la disponibilidad de cationes como el Ca (tabla 3.1). Estas correlaciones se podrían explicar en parte para el S, porque este es un elemento estructural de la nitrogenasa (Martínez-Argudo *et al.*, 2005). Por otra parte, correlaciones positivas entre Ca²⁺ y la actividad nitrogenasa se han reportado para simbiosomas desarrollados entre leguminosas y diazótrofos simbióticos (Andreev *et al.*, 2000). En este contexto, a pesar de que aún no es muy evidente la relación existente entre el calcio y la actividad de la nitrogenasa, nuestros resultados abren la posibilidad de que la aplicación de enmiendas de calcio mejoren la actividad de este grupo funcional en los cultivos de arroz; sin embargo, esta hipótesis debe ser evaluada en ensayos de campo, para poder adoptar la medida dentro de un programa integrado de fertilización.

Actividad proteasa

En el suelo, cerca del 90 % del N está presente en forma de N orgánico, el cual no es de fácil asimilación para las plantas. De este N, cerca del 40 % existe en forma de compuestos proteicos tales como proteínas, glicoproteínas, péptidos y aminoácidos (Schulten y Schnitzer, 1998). Estos compuestos actúan como sustrato para una serie de proteasas que en el suelo pueden ser tanto de origen vegetal como microbiano. Sin embargo, las proteasas de bacterias, actinomicetos y algunos hongos son las que presentan mayor actividad. La presencia de una fracción importante de N disponible en forma proteica sugiere que las proteasas generan una fuente significativa del N bio-disponible en el suelo, el cual puede ser asimilado por las plantas (Geisseler y Horwath, 2008), lo que condujo a la evaluación de dicha actividad enzimática en los suelos bajo estudio. En este contexto, la actividad proteasa se determinó según el método propuesto por Ladd y Butler (1970), adaptado en el POE (Procedimiento Operativo Estándar) núm. 6 de Avellaneda (2008), el cual se basa en la determinación de los aminoácidos liberados por la enzima tras 2 horas de incubación a 50 °C, en condiciones básicas (pH 8,1) y con caseína como sustrato. Los aminoácidos generados reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, formando un complejo azul que es determinado colorimétricamente a 700 nm. La curva de calibración se realizó con tirosina. Se llevaron a cabo tres repeticiones y dos blancos de reacción (muestras incubadas sin sustrato), para cada una de las tres réplicas de cada finca, para un total de nueve repeticiones y seis blancos por finca analizada.

Para el primer año, la actividad proteasa, en general, fue mayor en las fincas de Tolima que en las de Meta (figura 3.3). En Tolima se encontró que la actividad proteasa promedio de las fincas de Tolima norte ($504,30 \mu\text{g}$ de tirosina $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) fue significativamente superior a las de Tolima sur ($171,33 \mu\text{g}$ de tirosina $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Esta actividad enzimática presentó correlaciones positivas con todas las formas de N disponible medidas en este estudio (NH_4^+ , NO_3^- y % Nitrógeno Total) (tabla 3.1). Sin embargo, correlaciones con el N inorgánico no eran de esperar, dado que la disponibilidad de esta fuente de N podría inhibir la actividad proteasa en el suelo, toda vez que las formas disponibles de N de fácil asimilación para los microorganismos inducen a una represión en la síntesis y en la actividad de las proteasas (Ladd y Jackson, 1982), tal como se encontró para el amonio en los suelos de Tolima en el segundo año (tabla 3.1). Las fincas del Tolima norte mostraron niveles más altos tanto de materia orgánica como de % NT (capítulo 2), lo cual sugiere, como es de esperar (Bonmati *et al.*, 1991), una estrecha relación entre estas dos variables. Correlaciones negativas encontradas en este estudio entre la actividad proteasa y la disponibilidad de cationes (tabla 3.1) fueron también reportadas por Ladd y Butler (1970) en presencia de Mg y K.

El análisis de las 16 fincas durante el primer año mostró correlación positiva de r^2 : 0,59 entre la actividad de la proteasa y % MO. Se observó que las fincas de Tolima norte y la finca 13 de Meta, que poseen mayor actividad proteasa, también tienen los valores más altos de MO con valores de 3,56 % (para el promedio de fincas de Tolima norte, primer año; ver capítulo 2) y de 3,31 % (para la finca 13, resultados no mostrados). En este sentido, el porcentaje de MO podría ser una medida de la cantidad de sustrato disponible para dicha enzima. No se encontraron diferencias en la actividad proteasa para las fincas de Meta en el primer año, con excepción de la finca 13 (figura 3.3), que registró la mayor actividad proteasa ($375,53 \mu\text{g}$ de tirosina $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Finalmente, cabe señalar que la actividad proteasa se correlacionó positivamente con el amonio y el P, y negativamente con el Cu (tabla 3.1).

Para el segundo año de muestreo no se encontraron diferencias significativas en la actividad proteasa entre las fincas de Tolima. Por otra parte, merece mencionar que la actividad proteasa para las fincas del Tolima norte disminuyó con respecto al primer año (figura 3.3). Así mismo, se hallaron correlaciones negativas entre la actividad proteasa y la relación Mg/K, Ca+Mg/K y NH_4^+ , lo cual sugiere una inhibición de la actividad proteasa por cationes como el Mg y K que ya ha sido previamente reportada (Ladd y Butler, 1970), al igual que inhibición por la disponibilidad de N mineral en el suelo (Ladd y Jackson, 1982). Para Meta (figura 3.3), con excepción de la finca 15 (que durante este año se encontraba en un descanso prolongado), no se encontraron diferencias significativas en la actividad proteasa. La actividad enzimática registrada se correlacionó positivamente con el Cu y el porcentaje

de humedad (tabla 3.1), sugiriendo que la presencia de Cu (Wang *et al.*, 2009) y altos contenidos de humedad (Sardans *et al.*, 2008) pueden estar regulando la actividad de la proteasa. Por otra parte, la finca 15 no mostró actividad nitrogenasa en el segundo año, y su respuesta a la adición de fuentes de carbono fue bajo (figura 3.2), pero presentó la mayor actividad proteasa (1.151,22 μg de tirosina $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$) (figura 3.3), lo cual indica que la falta de entradas de N inorgánico al suelo, producto de un período relativamente prolongado sin actividad agrícola, favorece la mineralización de la materia orgánica, la cual proporciona fuentes de C y N para los microorganismos.

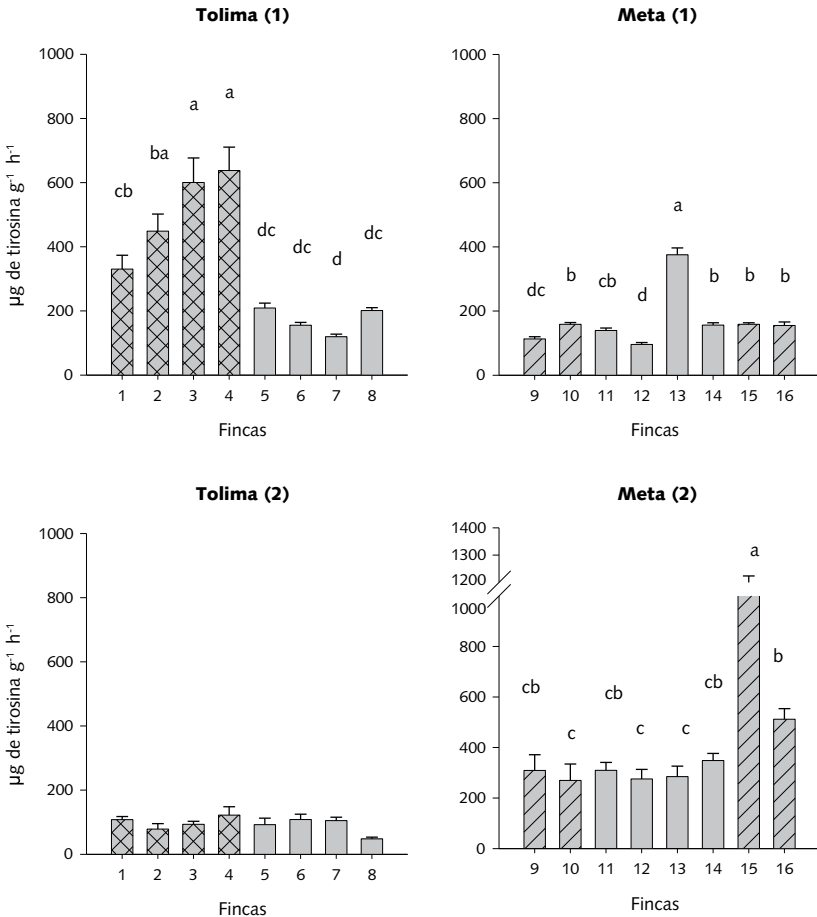


Figura 3.3 Actividad proteasa (μg de tirosina g de peso seco de suelo $^{-1}\text{h}^{-1}$) para los departamentos de Tolima (Tolima norte, fincas 1-4; Tolima sur, fincas 5-8) y Meta (Meta inundado, fincas 11-14; Meta seco, fincas 9, 10, 15 y 16) para el primero (1) y segundo año (2). Las barras corresponden al promedio con su respectivo error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) por test de comparación de Tukey.

Fuente: autores

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que:

1. Los recuentos en medios NFB, el potencial de la actividad nitrogenasa y la actividad proteasa fueron influidos por diversos parámetros físico-químicos del suelo.
2. La actividad nitrogenasa no fue detectada en los suelos bajo estudio, posiblemente debido a las altas concentraciones de fertilización nitrogenada aplicada en los programas de fertilización de los cultivos analizados.
3. La actividad proteasa se correlacionó con la presencia de materia orgánica y nitrógeno orgánico, indicando una estrecha relación entre estas variables; así mismo el período de descanso prolongado que se dio en la finca 15 favoreció la actividad proteasa, posiblemente debido a la falta de fertilización nitrogenada durante este período, estimulándose la búsqueda de fuentes alternativas de nitrógeno en la fracción orgánica del suelo.
4. El potencial de la actividad nitrogenasa indica que los suelos presentan limitantes energéticas que podrían ser suplidas por enmiendas orgánicas como la incorporación de tamo, y
5. Los resultados de este estudio sugieren que la aplicación de enmiendas microbianas diseñadas para suplir la demanda parcial de nitrógeno del cultivo de arroz basadas en la fijación biológica de N no es viable si no están acompañadas de la aplicación de otro tipo de estrategias, como la incorporación de materia orgánica al suelo.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias a la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, a través del contrato 2007B6423 161-1020/2007. Javier Vanegas agradece la financiación soportada por la convocatoria de “Apoyo a doctorados nacionales” de 2007, de Colciencias-Icetex-SENA.

Referencias

- Andreev, I. M., Andreeva, I. N., Kozharinova, G. M., Dubrovo, P. N., Krylova, V. V., & Izmailov, S. F. (2000). Accumulation of calcium and its involvement in the control of nitrogenase activity in the symbiosomes of broad bean root nodules. *Russian Journal of Plant Physiology*, 47(1), 10-16.
- Avellaneda, M. (2008). *Actividades enzimáticas de suelos con y sin historia de uso agrícola y manejo convencional y de sus consorcios bacterianos*. Tesis de Maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., & Dobereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology Fertility and Soils*, 30(5-6), 485-489.
- Barraquio, W. L., Daroy, M. L. G., Triol, A. C., Ladha, J. K., & Watanabe, I. (1986). Laboratory acetylene reduction assay for relative measurement of N₂-fixing activities associated with field grown wetland rice plants. *Plant and Soil*, 90(1-3), 359-372.
- Bonmati, M., Ceccanti, B., & Nanniperi, P. (1991). Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(4), 391-396.
- Charyulu, P. B. B. N., & Rao, V. R. (1981). Influence of carbon substrates and moisture regime on N₂-fixation in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 13(1), 39-42.
- Chen, W. C., Yen, J. H., Chang, C. S., & Wang, Y. S. (2009). Effects of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), 120-127.
- Choudhury, A., & Kennedy, I. R. (2004). Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biology and Fertility of Soils*, 39(4), 219-227.
- Christiansen-Weniger, C., & Vanderleyden, J. (1994). Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. *Biology and Fertility of Soils*, 17(1), 1-8.
- Colnaghi, R., Green, A., He, L., Rudnick, P., & Kennedy, C. (1997). Strategies for increased ammonium production in free-living or plant associated nitrogen fixing bacteria. *Plant and Soil*, 194(1-2), 145-154.
- Dick, W. A., & Tabatabai, M. A. (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. In B. Metting (Ed.). *Soil Microbial Ecology* (pp. 95-127). New York: Marcel Dekker.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H., & Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285-5293.
- Geisseler, D., & Horwath, W. R. (2008). Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(12), 3040-3048.
- Govindarajan, M., Balandreau, J., Kwon, S. W., Weon, H. Y., & Lakshminarasimhan, C. (2008). Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology*, 55(1), 21-37.

- Gyaneshwar, P., James, E. K., Reddy, P. M., & Ladha, J. K. (2002). *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium tolerant rice varieties. *New Phytologist*, 154(1), 131-145.
- Jackson, L. E., Burger, M., & Cavagnaro, T. R. (2008). Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 341-363.
- Kennedy, A. C., & Smith, K. L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170(1), 75-86.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A., & Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1229-1244.
- Ladd, J. N., & Butler, J. H. (1970). The effect of inorganic cations on the inhibition and stimulation of protease activity by soil humic acids. *Soil Biology and Biochemistry*, 2(1), 33-40.
- Ladd, J. N., & Jackson, R. B. (1982). In F. J. Stevenson (Ed.). *Nitrogen in Agricultural Soils* (pp. 173-228). WI, Madison: American Society of Agronomy.
- Ladha, J. K., Pareek, R. P., & Becker, M. (1992). Stem nodulating legume-rhizobium symbiosis and its agronomic use in lowland rice. *Advances in Soil Science*, 20(1), 147-192.
- Leganes, F. *et al.* (2001). Effect of phosphate fertilization, straw incorporation, insecticide application and inoculation with cyanobacteria on rice productivity. *Investigaciones Agrícolas: Producción y Protección Vegetal*, 16(2), 273-282.
- Liesack, W., Schnell, S., y Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 625-645.
- Lozano, A. (1998). *Determinación de la actividad nitrogenasa en cultivos de microorganismos diazótrofos*. (Guía de laboratorio). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Maron, P. A. *et al.* (2006). Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology*, 42(2), 65-73.
- Mårtensson, L., Díez, B., Warttinen, I., Zheng, W., El-Shehawy, R., & Rasmussen, U. (2009). Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant and Soil*, 325(1), 207-218.
- Martínez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., & Dixon, R. (2005). Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 152-156.

- Quintero, L. E., Acevedo, X., y Salazar, M. (2004). Costos de producción de arroz en Colombia. En Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio de Agrocadenas, *Documento de Trabajo* 41. Bogotá: autor.
- Rao, V. R. (1976). Nitrogen fixation as influenced by moisture content, ammonium sulphate and organic sources in a paddy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 8(5), 445-448.
- Rao, V. R., Ramakrishnan, B., Adhya, T. K., Kanungo, P. K., & Nayak, D. N. (1998). Review: Current status and future prospects of associative nitrogen fixation in rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 621-633.
- Reis, V., y Döbereiner, J. (1998). Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology*, 171(1), 13-18.
- Rennie, R. J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), 8-14.
- Roger, P. A., & Watanabe, I. (1986). Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: Potentialities, current usage, and limiting factors. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 9(1), 39-77.
- Sardans, J., Peñuelas, J., y Estiarte, M. (2008). Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology*. 39(2), 223-235.
- Schulten, H. R., & Schnitzer, M. (1998). The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 26(1), 1-15.
- Senthilkumar, M., Madhaiyan, M., Sundaram, S., & Kannaiyan, S. (2009). Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L.CvCO-43). *Microbiological Research*, 164(1), 92-104.
- Shrestha, R. K., & Maskey, S. L. (2005). Associative nitrogen fixation in lowland rice. *Nepal Agriculture Research Journal*, 6(1), 112-121.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19 (1), 1-30.
- Taylor, J. P., Wilson, B., Mills, M. S., & Burns, R. G. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoil using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(3), 387-401.
- Thakuria, D., Talukdar, N. C., Goswami, C., Hazarika, S., Kalita, M. C., & Bending, G. D. (2009). Evaluation of rice-legume-rice cropping system on grain yield, nutrient uptake, nitrogen fixation, and chemical, physical, and biological properties of soil. *Biology and Fertility of Soil*, 45(3), 237-251.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., & Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 177(5), 1414-1417.

- Verma, S., Ladha, J., & Tripathi, A. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3), 127-141.
- Wang, H., Wang, G., & Lin, Q. (2009). The Effects of Cu, Cd, Pb and Zn on the activities of urease, protease and peroxidase in acid cultivated soil. *Journal of Agro-Environment Science*, 28(7), 1427-1433.
- Zuberer, D. A., & Silver, W. S. (1978). Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(3), 567-575.

Actividad fosfatasa y microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato en suelos arroceros de Tolima y Meta

Mayra Beltrán¹, Catalina Camelo², Luz Marina Melgarejo²,
Javier Vanegas¹, Daniel Uribe-Vélez^{1,*}

¹ Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.

² Departamento de Biología,
Universidad Nacional de Colombia

• duribev@unal.edu.co

El fósforo (P) es, después del nitrógeno, el nutriente más importante para lograr el desarrollo de las funciones fisiológicas en los cultivos vegetales. Infortunadamente, el P se encuentra muy poco disponible para la planta, ya que mientras que la mayoría de compuestos en el suelo están presentes en cantidades milimolares, la concentración de P soluble en el suelo está en el rango de concentraciones micromolares o menos, incluso a pH de 6,5 donde el P es más soluble (He *et al.*, 2003). Esta situación es paradójica, toda vez que los suelos, particularmente los suelos tropicales, poseen concentraciones totales de P atrapado (no disponible), varios órdenes de magnitud por encima de las necesidades de la planta. Una gran proporción de este P (entre el 29 % y el 65 % del P total insoluble) corresponde a la fracción orgánica, la cual es considerada poco disponible para la planta (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2010). Por otra parte, está la fracción inorgánica, que tampoco se encuentra muy disponible, debido a la formación de complejos con iones del suelo como Ca^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} que secuestran este elemento (Igual *et al.*, 2001; Richardson, 2001; Yarzabal, 2010). La baja disponibilidad de P en el suelo ha conducido a la aplicación de altas cantidades de fertilizantes fosforados en los cultivos, generando condiciones poco amigables para el ambiente, como la contaminación de aguas subterráneas (Torrent *et al.*, 2007).

Se ha estimado que las explotaciones naturales de P, las cuales están concentradas en cinco países, estarán llegando a su máximo de producción entre el año 2034 y el año 2070, debido a una disminución de las fuentes conocidas de este recurso (Gross, 2009). La proximidad del desabastecimiento de P en el planeta se percibe aún más dramática cuando se valora la alta

dependencia de los procesos de extracción de este elemento en energías fósiles como el petróleo, lo cual tiene su incidencia en los precios de fertilizantes a nivel mundial (Gross, 2009). Es evidente entonces que la falta de medidas adecuadas tendientes a un desarrollo agrícola sostenible en función de este recurso tendrá un impacto devastador en el sector agrícola, toda vez que el 90 % del P producido en el planeta está destinado para dicho sector (Gross, 2009). Esta situación ha conducido a la necesidad de establecer un manejo más sostenible de la fertilización fosforada de los cultivos, lo cual supone comprender el papel de los microorganismos en la transformación de este elemento en el ambiente, con el objeto de proporcionar las condiciones que optimicen su asimilación para la planta. En este sentido, merece destacar que las bacterias y arqueas poseen la mayoría del nitrógeno y P del suelo, y cerca del 50 % del carbono almacenado en organismos vivos en el planeta (Allison y Martiny, 2008; Yarzabal, 2010), lo cual evidencia que un conocimiento del papel de los microorganismos en el ciclaje de estos elementos permitirá un manejo más sostenible de la agricultura.

El arroz es uno de los principales cultivos a nivel mundial; sin embargo, su crecimiento se ve limitado por la escasa disponibilidad de P en una gran variedad de suelos. Esto ha llevado a que la planta desarrolle una serie de mecanismos como la acidificación del medio por la producción de ácidos orgánicos que se acomplejan con el P atrapado con metales, con el objeto de movilizar este elemento y así permitir su asimilación por la planta (Li *et al.*, 2008). En Colombia, el cultivo de arroz se ha logrado establecer en cuatro zonas geográficas diferentes (Centro, Llanos Orientales, Caribe húmedo y Caribe seco), bajo tipos de suelo diferentes (e.g. oxisoles y alfisoles), prácticas y sistemas de riego contrastantes (e.g. seco e inundado) (capítulo 2) (Fedearroz, 2000). Estas variables poseen un efecto importante sobre las características biológicas, bioquímicas y fisicoquímicas relacionadas con la disponibilidad del P en el suelo, las cuales deben ser determinadas para optimizar el uso de este recurso en el sistema productivo del arroz. Los suelos de la zona Centro, por ejemplo, entre los que se encuentran los suelos de Tolima, son considerados con pocos problemas en torno a la fijación de P, mientras que los suelos de la Orinoquia y los de Meta poseen problemas de fijación debido a los altos contenidos de Al y Fe (Sánchez y Owen, 1984). Es fundamental entonces entender la dinámica de este nutriente en los cultivos de arroz, dada la importancia de este para el cultivo, particularmente en la fase inicial y de establecimiento del mismo.

Los microorganismos del suelo cumplen una serie de funciones dentro del ecosistema, que son determinantes en el establecimiento de las relaciones de las plantas con su entorno. La rizósfera es uno de los sitios más importantes para el desarrollo de dichas relaciones, y dentro de esta se pueden identificar los microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato, los cuales

contribuyen a la toma de nutrientes como el P, que de otra forma son escasos para la planta (Gyaneshwar *et al.*, 2002). En cuanto a la disponibilidad del P orgánico, está mediada predominantemente por la actividad enzimática de los microorganismos del suelo, ya que a pesar de que las plantas producen fosfatasa ácida y fitasas (Li *et al.*, 2008), la gran cantidad de biomasa bacteriana así como su alta actividad metabólica y su corta vida media, les permiten producir y liberar mayores cantidades de enzimas extracelulares que las que podrían liberar las plantas (Dick y Tibatabai, 1993; Yadav y Tarafdar 2003). Así mismo, se ha logrado determinar que enzimas como la fosfatasa ácida (FAC), de origen microbiano, poseen mejor actividad hidrolítica sobre compuestos orgánicos que enzimas homólogas de origen vegetal (Tarafdar *et al.*, 2001). Por otra parte, las plantas superiores no producen la enzima fosfatasa alcalina (FAL), por lo que su presencia en el suelo es de origen netamente microbiano (Juma y Tabatabai, 1988). Finalmente, están las fitasas, cuyo sustrato es el fitato o ácido fítico (mio-inositol hexafosfato), que es la forma predominante del P orgánico en el suelo, el cual no puede ser asimilado directamente por la planta (Patel *et al.*, 2010). Por tal motivo, se ha sugerido que las fitasas de origen microbiano (bacterias, hongos y levaduras, principalmente) estén involucradas en la promoción de crecimiento vegetal, en suelos donde el fitato es una fuente importante de P orgánico (Ramírez y Klopper, 2010; Richardson, 2001).

En cuanto a las fuentes de P inorgánico, es ampliamente aceptado que un número considerable de bacterias y hongos poseen la capacidad de solubilizar/liberar el P atrapado en la fracción inorgánica del suelo (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Yarzabal, 2010). Diversos mecanismos han sido descritos, que contribuyen a esta capacidad y la posterior toma de este elemento por la planta, entre los que merece destacar:

- a. la acidificación por medio de protones (H^+) y ácidos orgánicos que, además de acidificar el medio, a su vez quelan el P atrapado en la fracción inorgánica;
- b. la absorción de P a través de las membranas celulares y su posterior acumulación en estructuras como las biopelículas, que a expensas de los exopolisacáridos que los forman, aparentemente acumulan el P obtenido de la fracción mineral;
- c. la movilización de P asimilado por la biomasa microbiana, producto de su descomposición;
- d. la reducción de óxido férrico bajo condiciones anaerobias, típica de cultivos de arroz, que libera el P atrapado y el ion Fe^{2+} , y
- e. una serie de mecanismos indirectos, como la producción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal, que incrementan el crecimiento de la raíz y sus pelos radicales, así como la toma de nutrientes a partir de micorrizas o incluso bacterias “ayudadoras de micorrizas”, que

mejoran la colonización de los hongos micorrícicos, enriqueciendo así la relación planta-microorganismo y, por ende, sus beneficios para la planta (Frey-Klett *et al.*, 2005; Marshner *et al.*, 2011; Rodríguez y Fraga, 1999; Yarzabal, 2010).

Si bien es ampliamente aceptado que los microorganismos pueden desempeñar un papel importante en la toma de nutrientes como el fósforo para la planta, estos también pueden interferir disminuyendo su asimilación por diversos mecanismos. En este sentido cabe destacar: a) la inmovilización de P en la biomasa microbiana; b) la interferencia en los mecanismos de solubilización de P propios de la planta, como la degradación de ácidos orgánicos de origen vegetal o el consumo de protones de la fracción mineral del suelo, para llevar a cabo procesos como la amonificación, de tal forma que en lugar de lograr una disminución en el pH, se logre un efecto contrario; y c) afectando negativamente el crecimiento de la raíz o incluso la relación planta-micorriza (Marshner *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta todas las consideraciones arriba mencionadas, y dada la importancia del P para el cultivo del arroz y el potencial de los microorganismos para afectar la disponibilidad de este nutriente para la planta, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación global del papel de algunos microorganismos solubilizadores de fosfato cultivables, así como de la actividad microbiana asociada a la mineralización del P orgánico mediante la evaluación de la actividad de las enzimas *FAC* y *FAL* en los suelos bajo estudio, así como la relación con las variables fisicoquímicas relevantes que determinan el ciclo del P en los suelos arroceros bajo estudio.

Estimación de la población de microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato en suelos productores de arroz de Tolima y Meta

Con el fin de determinar la población de microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato, se realizaron diferentes salidas de campo, en donde se recolectaron muestras representativas de 16 fincas arroceras, ocho de Tolima y ocho de Meta (capítulo 2), las cuales fueron evaluadas durante el primer período de siembra de los años 2008 y 2009. La metodología para la toma de muestras de suelo, así como la descripción general de las fincas se menciona con más detalle en el capítulo 2. Las submuestras empleadas para los recuentos fueron homogeneizadas y almacenadas a 4 °C.

Con el fin de tener una estimación de la población global de microorganismos solubilizadores de fosfato cultivables, se llevó a cabo una serie de diluciones seriadas en el medio selectivo NBRI-P (National Botanical Research Institute Phosphate growth medium) (Nautiyal, 1999), suplementado con diferentes fuentes de fosfato inorgánico como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ al 0,5 %, AlPO_4 al 0,3 %, FePO_4 al 0,5 %, según el tipo de microorganismos solubilizadores de fosfa-

to que se estaba analizando. Posteriormente, se incubaron a 28 °C durante 14 días para el caso de los medios de cultivo crecidos en presencia de fosfato de calcio, hasta la aparición de halos claros alrededor de las colonias de microorganismos solubilizadores de fosfato. Para el caso de los microorganismos solubilizadores de fosfato de aluminio y hierro no se lograron evidenciar halos de solubilización; por tal motivo, se asumió que aquellos organismos que crecían en este medio tenían la capacidad de asimilar el P insoluble, y por ello se realizó un recuento de las colonias totales obtenidas en dichos medios (figura 4.1). La población de microorganismos mineralizadores de P fue determinada empleando el medio NBRIP con ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24} \cdot xNa \cdot H_2O$) al 1 % (Phytic acid sodium salt hidrate SIGMA®) como única fuente de P orgánico (figura 4.1).

Los resultados encontrados en los diferentes recuentos de los grupos funcionales evaluados en este trabajo indican que existen diferencias puntuales entre las fincas analizadas. Esto sugiere que la distribución de los microorganismos cultivables solubilizadores de fosfato obedece a una serie de factores específicos de cada finca, que se escapan a diferencias globales enmarcadas por ejemplo por el tipo de suelo. Esta situación cobra importancia en el marco de este trabajo, ya que los análisis presentados en el capítulo 2 permitieron describir dos grandes regiones, Tolima y Meta, con dos subregiones cada una, Tolima norte, Tolima sur y Meta con sistemas de cultivo de arroz seco e inundado, respectivamente. A pesar de lo mencionado arriba, se pueden observar algunas tendencias específicas como la presencia de mayores recuentos de microorganismos solubilizadores de fosfato de aluminio en la zona de Meta, particularmente para el año 2. Igualmente, se puede observar la presencia de mayores recuentos de microorganismos solubilizadores de fosfato de hierro en las fincas de Tolima norte en relación con las de Tolima sur, e incluso la presencia de mayores recuentos de microorganismos que crecen en ácido fítico como única fuente de P en las fincas de Meta con respecto a las de Tolima (figura 4.1). Es posible que estos patrones obedezcan a factores intrínsecos relacionados con el tipo de suelo, como por ejemplo, el mayor contenido de aluminio en los suelos de la zona de Meta; sin embargo, el análisis de correlación no mostró alguna tendencia específica. También es probable que la falta de definición en términos de un patrón de distribución de estos grupos en función de las zonas bajo estudio obedezca al bajo poder de definición intrínseco de la técnica de recuento en placa, además del hecho de que un alto porcentaje de los microorganismos identificados como solubilizadores de P son hongos, los cuales, al contrario de las bacterias, no permitieron evidenciar diferencias muy marcadas entre subregiones según el análisis de los microorganismos no cultivables (capítulo 6).

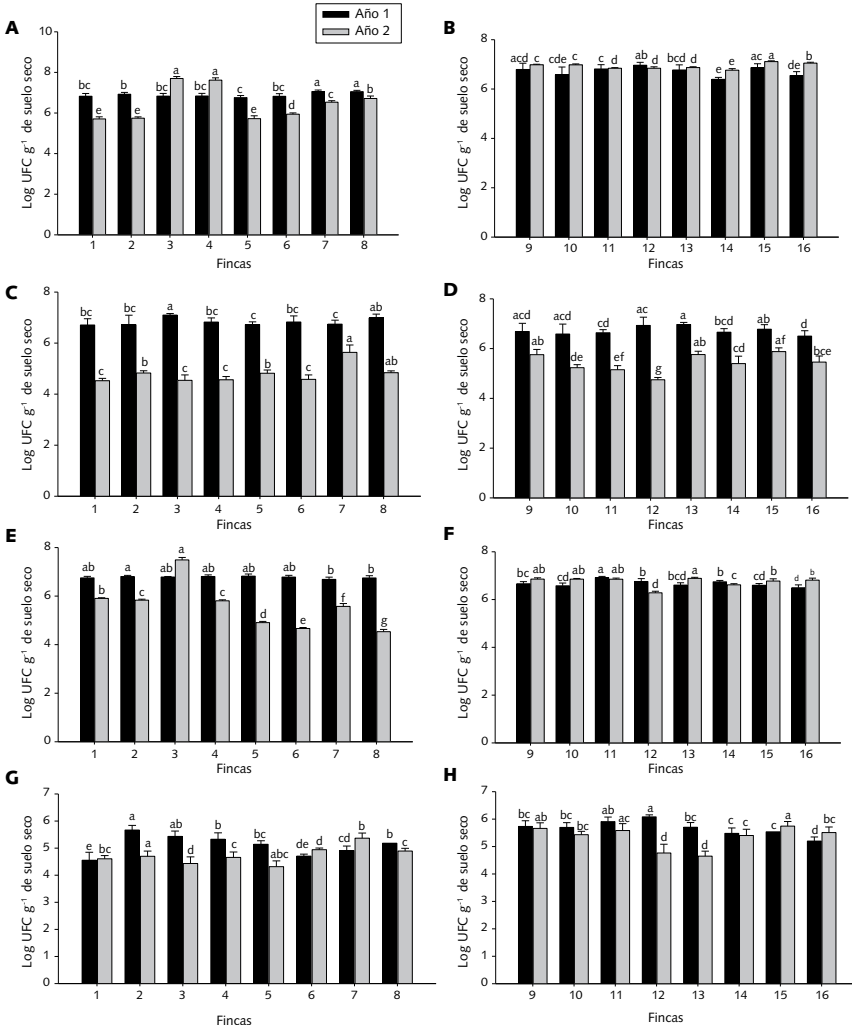


Figura 4.1 Recuentos microbianos de bacterias asimiladoras de diferentes fuentes de fósforo insoluble: Fosfato de calcio (A–B), Fosfato de aluminio (C–D), Fosfato de hierro (E–F), Ácido fítico (G–H), para el departamento de Tolima (Columna izquierda A–G) y Meta (Columna derecha B–H). Para las fincas de Meta (fincas 9-10 y 15-16 corresponden a cultivos secanos, y las fincas 11-14 a cultivos inundados). Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, de acuerdo con el test por pares de Kruskal Wallis a un $P \leq 0,05$.
Fuente: autores

A pesar de lo mencionado arriba, el análisis de las correlaciones de los recuentos de microorganismos solubilizadores de fosfato, particularmente para la zona de Meta, mostraron una relación entre las bacterias solubi-

lizadores de fosfato de calcio (BSF) y los microorganismos que crecen en fosfato de calcio (CFC), fosfato de aluminio (CFA) y fosfato de hierro (FH) (tabla 4.2). Así mismo, se encontró una correlación entre los microorganismos que crecen en presencia de ácido fítico (AF) y aquellos que CFC y FH (tabla 4.1) y particularmente en Meta aquellos que CFA y CFC para el año 1 (tabla 4.1) y los que CFA y las BSF y los microorganismos que crecen en FH (tabla 4.2). Estos resultados indican que especialmente para la zona de Meta existe una estrecha relación entre los diferentes grupos de microorganismos asociados a la solubilización de fosfato inorgánico y orgánico, sugiriendo que estos grupos podrían estar relacionados e incluso podrían ser un mismo grupo funcional, si se tiene en cuenta que los mecanismos de acción involucrados en la solubilización de P de todas estas fuentes es muy similar (Marshner *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2010; Rodríguez y Fraga, 1999; Yarzabal, 2010).

Las tablas 4.1 y 4.2 de las correlaciones de los diferentes grupos funcionales muestran que los diferentes cationes tipo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ y algunas de sus relaciones poseen marcada influencia sobre los recuentos de los grupos de microorganismos que crecen sobre FH (en Tolima, Mg^{2+} , K^+ y Na^+ , año 1, y Ca^{2+} , año 2, y para Meta, Ca^{2+} y Mg^{2+} , año 1), CFA (Tolima, Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ , año 2) y AF (en Tolima, Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ , año 1, y Mg^{2+} y K^+ , año 2, y para Meta, Ca^{2+} , año 1, y Ca^{2+} y Mg^{2+} , año 2) como única fuente de P, los cuales están conformados básicamente por hongos filamentosos. En este sentido, llama particularmente la atención la correlación negativa entre los que crecen FH y AF y el calcio (tablas 4.1 y 4.2), fenómeno que fue igualmente evidenciado entre el recuento general de hongos y el Ca^{2+} ($r^2 = -0,48$, $p \leq 0,1$). Muy posiblemente, la razón para este hecho yace en el efecto del Ca^{2+} sobre el incremento en el pH, que en los suelos bajo estudio presentó una correlación de $r^2 = 0,75$ ($P \leq 0,05$), ya que como es bien sabido, un incremento en el pH del suelo conduce a un detrimento de las poblaciones de hongos (Weyman-Kaczmarkowa y Pedziwilk, 2000). Estos resultados sugieren que incrementos en los valores de pH pueden ejercer efecto sobre la regulación de las poblaciones de este grupo de microorganismos en el cultivo de arroz, lo cual estaría en detrimento de los grupos funcionales arriba mencionados, pero igualmente podría ejercer efecto sobre las poblaciones de hongos fitopatógenos en estos cultivos, ya que incrementos en el pH es una estrategia actualmente empleada para el control de hongos fitopatógenos en otras circunstancias (Abdulkadir y Aminu, 2007).

Los resultados encontrados en este estudio indican una fuerte correlación entre el N-NO_3 y los microorganismos que crecen en AF (Tolima, años 1 y 2, Meta, año 2), FH (Tolima, año 1) y CFA (Tolima, año 2) como única fuente de P (tablas 4.1 y 4.2).

Tabla 4.1 Correlaciones obtenidas entre los recuentos de los diferentes grupos funcionales relacionados con la solubilización y mineralización de fosfato de las fincas de Tolima y Meta, año 1.

Variable	Primer año de muestreo													
	Fincas Tolima							Fincas Meta						
	CFC	CFA	FH	AF	BSF	HSF	CFC	CFA	FH	AF	BSF	HSF		
AF				---			0,70		0,67	---				
CFA		---					0,63	---						
FH	-0,70		---						---					
pH			-0,80*	-0,68					0,78*					
Ca				-0,63					-0,76*					
Mg			-0,78*	-0,76*					-0,72*					
K			-0,83*											
Mg/K				-0,81*								-0,68		
Ca/K												-0,72*		
Ca+Mg/K												-0,66		
Na			-0,75*	-0,78*								-0,64		
ClC				-0,76*										
Fe	0,83*													
P														
Cu								0,80*				0,67		
Mn		-0,67					0,74							
Zn				0,63										
NT		0,68												
N-NO ₃			0,78*	0,77*										
Arcilla				-0,77*							0,63	0,68		
Limo												-0,82*		
Arena				0,72*								0,94*		
% H												-0,69		

Los espacios vacíos indican ausencia de correlaciones estadísticamente significativas; los valores sin asterisco (*) representan correlaciones con un $P \leq 0,1$; los valores con asterisco (*) denotan correlaciones con un $P \leq 0,05$.

CFC: microorganismos que crecen en fosfato de calcio; CFA: microorganismos que crecen en fosfato de aluminio; FH: microorganismos que crecen en fosfato de hierro; AF: microorganismos que crecen en ácido fítico; BSF: bacterias solubilizadoras de fosfato; HSF: hongos solubilizadores de fosfato; Ca: calcio; Mg: magnesio; K: potasio; Na: sodio; ClC: capacidad de intercambio catiónico; Fe: hierro; Cu: cobre; Mn: manganeso; Zn: zinc; NT: nitrógeno total; N-NO₃: nitrógeno asociado al nitrato; % H: porcentaje de humedad.

Fuente: autores

Tabla 4.2 Correlaciones obtenidas entre los recuentos de los diferentes grupos funcionales relacionados con la solubilización y mineralización de fosfato de las fincas de Tolima y Meta, año 2.

Variables	Segundo año de muestreo													
	Fincas Tolima							Fincas Meta						
	CFC	CFA	FH	AF	BSF	HSF	CFC	CFA	FH	AF	BSF	HSF		
AF		0,72*		---										
BSF	0,69				---		0,79*	0,83*	0,76*	--				
HSF		-0,64				---							---	
FH			---					0,69	---					
pH			-0,74*				-0,75*							
Ca		0,67	-0,65			-0,79*	0,68		-0,74*					
Mg		0,85*		0,76*		-0,72*			0,70		0,68			
K		0,72*		0,63										
Ca/Mg			-0,66		-0,74*		-0,92*				-0,65			
Mg/K						-0,72*						0,68		
Ca/K			-0,71*			-0,76*						0,66		
Ca+Mg/K			-0,69			-0,78*						0,68		
Na					-0,73*									
CIC		0,70				-0,74*	0,66		0,69					
P						-0,64			-0,63					
Cu						-0,78*								
Al							0,68							
Fe					-0,62									
B										0,68				
Mn						0,82*								
NT				-0,63										
N-NO ₃		0,98*		0,74*						0,65	0,67		0,75*	

continúa

Tabla 4.2 Correlaciones obtenidas entre los recuentos de los diferentes grupos funcionales relacionados con la solubilización y mineralización de fosfato de las fincas de Tolima y Meta, año 2 (continuación).

Variables	Segundo año de muestreo											
	Fincas Tolima						Fincas Meta					
	CFC	CFA	FH	AF	BSF	HSF	CFC	CFA	FH	AF	BSF	HSF
Arcilla	-0,71*		-0,79*									-0,67
Limo						-0,75*	0,70	0,72*		0,78	0,77	
Arena						0,77*	-0,66		-0,68	-0,83*	-0,72*	
% H							0,62					
S			0,78*				0,81*				0,78*	

Los espacios vacíos indican ausencia de correlaciones estadísticamente significativas; los valores sin asterisco (*) representan correlaciones con un $P \leq 0,1$; los valores con asterisco (*) denotan correlaciones con un $P < 0,05$.

CFC: microorganismos que crecen en fosfato de calcio; CFA: crecen en fosfato de aluminio; FH: microorganismos que crecen en fosfato de hierro; AF: microorganismos que crecen en ácido fítico; BSF: bacterias solubilizadoras de fosfato; HSF: hongos solubilizadores de fosfato; Ca: calcio; Mg: magnesio; K: potasio; Na: sodio; ClC: capacidad de intercambio catiónico; Cu: cobre; Al: aluminio; Fe: hierro; B: Boro; Mn: manganeso; Zn: zinc; NT: nitrógeno total; N-NO₃: nitrógeno asociado al nitrato; % H: porcentaje de humedad; S: Azufre.

Fuente: autores

Estos resultados sugieren que la distribución de estos grupos funcionales en el agro-ecosistema de arroz, particularmente en Tolima, está determinada en buena medida por la disponibilidad de nitrógeno ($N-NO_3$) en el suelo, lo cual está en concordancia con diversos estudios que han mostrado que la abundancia y la estructura de la comunidad fúngica están estrechamente relacionadas con la calidad y disponibilidad de nutrientes (e.g. nitrógeno) en el ambiente (Allison *et al.*, 2007; Lauber *et al.*, 2008). La identificación de este tipo de relaciones es importante para tener en cuenta en el momento de aplicar enmiendas microbianas tendientes a mejorar la disponibilidad de P en cultivos de arroz, a través de la mineralización o solubilización de compuestos orgánicos o fracciones inorgánicas, respectivamente.

Finalmente, cabe mencionar las correlaciones encontradas (algunas positivas y otras negativas), entre los diferentes grupos funcionales analizados y factores de la física de suelos, como el porcentaje de limo, arena y arcilla (tablas 4.1 y 4.2). Estos factores que determinan la estructura del suelo han sido documentados por sus efectos en la distribución de microorganismos en el ambiente edáfico, particularmente para las comunidades fúngicas (Lauber *et al.*, 2008; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). El efecto mencionado tiene relación con algunos grupos funcionales, y además difiere en relación con la zona o tipo de suelo, ya que, por ejemplo, en el caso de microorganismos que crecen en AF, se evidencia una correlación negativa con el contenido de arcilla en los suelos de Tolima ($r^2 = -0,77$, $p \leq 0,05$) para el primer año, mientras que para el mismo grupo funcional y mismo año, en Meta se observa correlación positiva ($r^2 = 0,68$, $p \leq 0,1$). Situación similar se presenta para los microorganismos que crecen en fosfato de hierro pero en años diferentes (tablas 4.1 y 4.2).

Determinación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina

La actividad enzimática del suelo ha sido identificada como uno de los parámetros bioquímicos más relevantes como indicador de la calidad y salud del suelo (Dick, 1992). Esto se debe a su papel en diferentes funciones dentro del ecosistema, como el procesamiento y ciclaje de nutrientes, su influencia en la eficiencia en el uso de fertilizantes, su papel como indicador de la actividad biológica de los microorganismos y de cambios en las condiciones físico-químicas del suelo (Dick *et al.*, 2000). Las fosfatasas corresponden a un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídros de ácido fosfórico, siendo las fosfatasas ácidas y alcalinas hidrolasas de ácidos monoéster fosfóricos (Deng y Tabatabai, 1997). Estas enzimas son de gran valor agronómico, puesto que transforman compuestos de fósforos orgánicos en fósforos inorgánicos que pueden ser asimilados por la planta; por tanto, las variaciones en la actividad fosfatasa no solo son indicadores de cambios en la cantidad y calidad de sustratos fosforados del suelo, sino que son indicadores del estado biológico de los mismos

(Pascual *et al.*, 1997, 2002). Particularmente, la relación enzimática entre la fosfatasa alcalina y la fosfatasa ácida (FAL/FAC) ha sido sugerida como un indicador del estatus del pH en el suelo, condición que es muy importante para determinar la condición de fertilización y el potencial productivo en el suelo (Dick *et al.*, 2000).

Para evaluar la actividad enzimática de la FAC y la FAL de las 16 fincas de arroz ubicadas en Tolima y Meta, se siguió el método propuesto por Tabatabai y Bremner (1969) y Eivazi y Tabatabai (1977), adaptado en el POE (Procedimiento Operativo Estándar) núm. 5 de Avellaneda (2008). Brevemente este procedimiento consiste en la determinación del p-nitrofenol liberado por la enzima tras una hora de incubación a 37 °C, en condiciones ácidas (pH 6,5) y alcalinas (pH 11), respectivamente. El p-nitrofenol se extrae y colorea con hidróxido de sodio para ser determinado colorimétricamente a 400 nm. La curva de calibración se realizó con p-nitrofenol, y se llevaron a cabo tres repeticiones y dos blancos de reacción (muestras incubadas sin sustrato), para cada una de las tres réplicas por finca, para un total de nueve repeticiones y seis blancos por finca analizada.

La figura 4.2 muestra la actividad enzimática de FAC y FAL asociada a las 16 fincas analizadas en este estudio durante los dos años de muestreo. En general, se observa mayor actividad en términos de la FAC respecto a la FAL, lo cual es de esperar, toda vez que la actividad de la primera posee un origen microbiano y vegetal, mientras que la FAL, un origen netamente microbiano (Dinkelaker y Marschner, 1992; Juma y Tabatabai, 1988). El análisis estadístico no mostró correlación entre la actividad de estas dos enzimas y el porcentaje de la materia orgánica (% MO) de los suelos bajo estudio, correlaciones que eran de esperar y que además han sido reportadas en otros estudios similares (Deng y Tabatabai, 1997). La falta de correlación entre estas variables es producto de los estrechos rangos en las variaciones en términos del % MO presentes en los suelos bajo estudio que durante los dos años oscilaron entre 5,8 y 2,5 % MO para los suelos de Tolima y entre 3,4 y 2,0 % MO para los suelos de Meta (capítulo 2). A pesar de la falta de correlación con % MO, sí se pudo observar alta correlación positiva entre la CIC y la FAL para Tolima y con la FAC para el caso de Meta (particularmente en el primer año de muestreo para esta última enzima) (tabla 4.3). Es importante resaltar esta correlación al momento de definir marcadores funcionales de calidad del suelo ya que, tanto la CIC como la actividad enzimática de las fosfatasas, se consideran indicadores del estado de fertilización y están estrechamente relacionados (Lara, 2003; Pascual *et al.*, 2002).

El pH es reconocido como un factor que posee gran influencia sobre los procesos biológicos, incluyendo la actividad microbiana, los cuales a su vez ejercen efecto sobre la fertilización y productividad en los cultivos (Dick *et al.*, 2000). En este estudio se encontró correlación negativa entre la

Actividad fosfatasa y microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato en suelos arroceros de Tolima y Meta

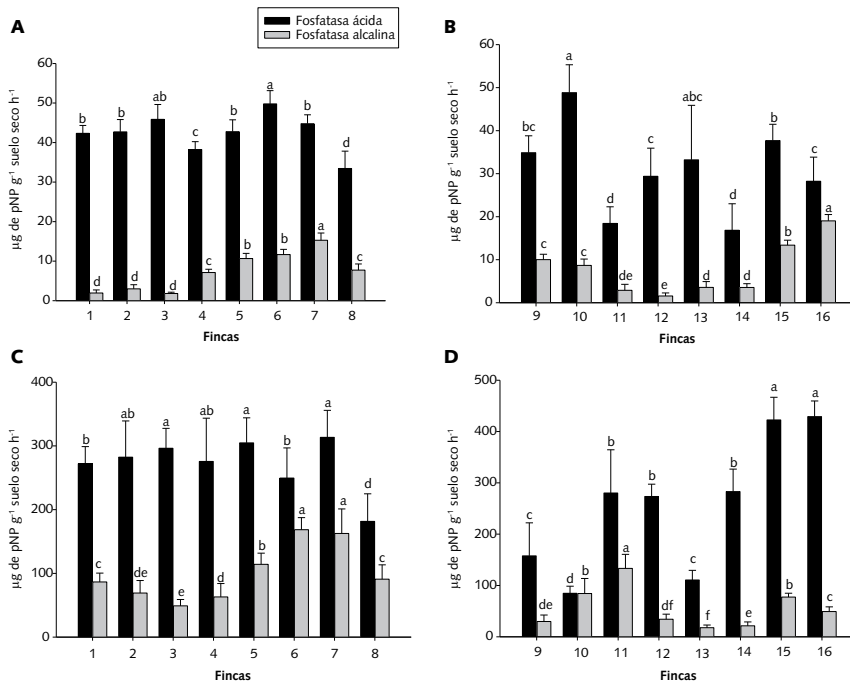


Figura 4.2 Actividad fosfatasa de las fincas arroceras de estudio en los departamentos de Tolima (Columna A–C) y Meta (Columna B–D), para el primer año de muestreo (Fila A–B) y el segundo año de muestreo (Fila C–D). Fincas 1-8 y 11-14, cultivos en sistema inundado; fincas 9, 10, 15 y 16, cultivos en sistema seco. Las barras corresponden al promedio de la actividad, expresada en μg de p-nitrofenol por gramo de suelo seco por hora. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, de acuerdo con Kruskal Wallis ($P \leq 0,05$).

Fuente: autores

FAC y el pH para los suelos de Meta ($r^2 = -0,67$, $p \leq 0,1$) y Tolima ($r^2 = -0,7$, $p \leq 0,1$) en el primer y segundo año, respectivamente. Esta correlación era de esperar, toda vez que la actividad enzimática óptima para esta enzima se encuentra, como su nombre lo indica, a pH ácidos (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000; Dick *et al.*, 2000). Así mismo, se halló un efecto importante ($P \leq 0,05$) del pH sobre la actividad de la FAL tanto para los suelos de Tolima como de Meta. Para el caso de los suelos de Tolima, esta correlación, como era de esperar, fue positiva (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000); sin embargo, para Meta la correlación fue negativa ($r^2 = -0,89$). Se observa que los valores más altos de la fosfatasa alcalina (figura 4.2) coinciden con las fincas que se encuentran bajo sistema de riego seco, las cuales a su vez tienen los valores más bajos de pH, oscilando entre 4,5 y 4,9, mientras que las fincas inundadas presentan rangos de pH entre 5,2 y 5,7 (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que, a pesar de que el pH tiene efecto importante sobre la

actividad enzimática de la FAL, bajo las condiciones de cultivo seco, existen otros factores diferentes que están favoreciendo esta actividad enzimática. Estas diferencias, como bien se mencionó antes, muy posiblemente están relacionadas con mayor disponibilidad de oxígeno en el suelo, que favorece la distribución de microorganismos aeróbicos que, como los hongos, contribuyen notablemente a la actividad de la FAL en el suelo, e incluso son más tolerantes a pH ácido que las mismas bacterias, las cuales, por el contrario, toleran más fácilmente las condiciones de anaerobiosis presentes en los suelos bajo inundación. Tal interpretación está igualmente sustentada por la correlación negativa entre fosfatasa ALC y % Humedad ($r^2 = -0,63$, $p \leq 0,1$) presente en el primer año de muestreo para las fincas de Meta (tabla 4.3).

En particular, para Tolima se observa alta correlación entre la presencia de diferentes cationes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ con la actividad de la FAL (tablas 3 y 4). Esta correlación posiblemente está asociada con el efecto de dichos cationes sobre el pH, toda vez que para ambos años se observó una alta correlación entre Ca^{2+} ($r^2 = 0,75$, $P \leq 0,05$) y Mg^{2+} ($r^2 = 0,68$, $P \leq 0,05$) con el pH. Esta situación podría incluso explicar las diferencias entre ambas zonas de Tolima en términos de la actividad de FAL, ya que, como se observó en el capítulo 2, la zona de Tolima sur, que aquí presenta las actividades más altas de la enzima, también manifiesta los valores más altos de Ca^{2+} , Mg^{2+} y pH, a pesar de que los últimos dos valores no son estadísticamente significativos (capítulo 2).

La actividad enzimática reportada en este trabajo no mostró correlación directa con el P disponible para el primer año; sin embargo, para el segundo año mostró correlación positiva entre la FAL y el P ($r^2 = 0,71$, $p \leq 0,05$) en el caso de Tolima, mientras que para Meta mostró correlación negativa ($r^2 = -0,76$, $p \leq 0,05$). De cualquier forma, se está evidenciando un efecto importante de la actividad de la FAL sobre la disponibilidad de P en los suelos bajo estudio, la cual podría estar determinada a su vez por el efecto de la materia orgánica, ya que el análisis de las características físicas y químicas del suelo para el segundo año mostró correlación negativa ($r^2 = -0,76$, $p \leq 0,1$) entre la MO y el P para el segundo año. Estos resultados sugieren que el contenido de MO está "secuestrando" el P en el suelo, que podría estar siendo liberado gracias a la acción de los microorganismos vía mineralización, producto de la acción de la FAL, particularmente en el caso de Tolima. Para el caso de Meta, posiblemente la mineralización del P a través de la actividad de la FAL esté teniendo efecto sobre la baja disponibilidad de P, a expensas de la inmovilización de este elemento en la biomasa microbiana; sin embargo, mediciones más detalladas en términos de la presencia de P inmovilizado deben ser realizadas para poder llegar a ese tipo de conclusiones.

Finalmente, cabe mencionar las correlaciones negativas entre la FAL y algunos grupos funcionales en el primer año para el caso de Tolima, como las

Actividad fosfatasa y microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato en suelos arroceros de Tolima y Meta

Tabla 4.3 Correlaciones Tolima y Meta, primer año, entre la actividad enzimática de las enzimas fosfatasa ácida (FAC) y fosfatasa alcalina (FAL) y las variables fisicoquímicas y biológicas asociadas al ciclaje de P con un $P \geq 0,1$ (sin asterisco) y con un $P \geq 0,05$ (con asterisco).

Variables	Primer año			
	Tolima		Meta	
	FAC	FAL	FAC	FAL
pH		0,73*	-0,67	-0,89*
Ca		0,87*		
Mg		0,65	0,744	
Ca/Mg			-0,67	
K		0,76*		
CIC		0,72*	0,67	
Zn		-0,69	0,088	0,88*
Al			0,65	
Fe			-0,63	
NT		-0,67		
N-NH ₄		-0,85*		-0,71*
N-NO ₃		-0,67		0,87*
% Humedad				-0,63
Limo		0,71*		0,75*
Arena		-0,67		
ARA		-0,76*		-0,65
PROT		-0,71*		
BCEL		-0,65		
PDA	-0,67			
BSF		0,64		
HCEL				0,86*
AN				-0,92*
ACT			0,76*	
FH			-0,65	-0,75*
AF				-0,77*

Los espacios en blanco equivalen a relaciones que no tienen significancia estadística.

Ca: calcio; Mg: magnesio; K: potasio; CIC: capacidad de intercambio catiónico; Zn: zinc; Al: aluminio; Fe: hierro; NT: nitrógeno total; N-NH₄: nitrógeno asociado al amonio; N-NO₃: nitrógeno asociado al nitrato; ARA: actividad nitrogenasa; P-ARA: potencial de la nitrogenasa; PROT: actividad proteasa; BCEL: bacterias celulolíticas; PDA: recuento de hongos totales en medio agar papa dextrosa; BSF: bacterias solubilizadoras de fosfato; HCEL: hongos celulolíticos; AN: recuento de bacterias crecidas en agar nutritivo; ACT: actinomicetes; FH: microorganismos que crecen en fosfato de hierro; AF: microorganismos que crecen en ácido fítico.

Fuente: autores

Tabla 4.4 Correlaciones Tolima y Meta, segundo año, entre la actividad enzimática de las enzimas fosfatasa ácida (FAC) y fosfatasa alcalina (FAL) y las variables fisicoquímicas y biológicas asociadas al ciclaje de P con un $P \geq 0,1$ (sin asterisco) y con un $P \geq 0,05$ (con asterisco). Los espacios en blanco equivalen a relaciones que no tienen significancia estadística. Las abreviaciones como en tabla 4.3.

Variables	Segundo año			
	Tolima		Meta	
	FAC	FAL	FAC	FAL
pH	-0,7			
Ca		0,89*		
Mg		0,74*		
K		0,77*		
Mg/K	-0,7			
Ca/K				-0,69
Ca+Mg/K				-0,69
P		0,71*		-0,76*
N-NH4				0,64
CIC		0,79*		
P. ARA			-0,73*	
PROT			0,68	
BCEL			-0,65	

Fuente: autores

bacterias celulolíticas y los microorganismos proteolíticos y los fijadores de nitrógeno, representados, en la tabla 4.3, por la actividad enzimática de las proteasas (PROT) y la nitrogenasa (ARA), respectivamente. Situación similar se puede observar con el recuento de bacterias totales, los fijadores biológicos de nitrógeno (ARA), los organismos que crecen en fosfato de hierro y ácido fítico como única fuente de fósforo para el caso de Meta. Estas correlaciones negativas sugieren una especie de competencia entre los grupos funcionales mencionados y aquellos relacionados con la mineralización del fósforo a través de la FAL, e indican que el P puede ser un factor limitante para la actividad microbiana en los suelos bajo estudio.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo permitieron determinar:

1. La presencia de un grupo importante de microorganismos asociados a la solubilización y mineralización de fosfato en los suelos arroceros de Tolima y Meta, lo que sugiere que la utilización de enmiendas microbianas asociadas a dichos grupos funcionales podría tener un efecto positivo sobre los cultivos arroceros.

2. Existen características puntuales entre zonas y subzonas de muestreo, e incluso entre fincas, que determinan la actividad/abundancia de estos grupos funcionales; en este sentido cabe destacar las diferencias entre cultivos secanos e inundados de Meta, que para este grupo funcional en particular ejercen un efecto muy importante.
3. Se determinó que ciertas condiciones químicas y físicas del suelo, como el pH y la textura, tienen efecto sobre la abundancia y actividad de estos grupos funcionales.
4. Se identificó el efecto del estado nutricional del cultivo sobre la actividad/abundancia de los solubilizadores y mineralizadores de fosfato, ya que la presencia de niveles altos de Ca^{2+} aparentemente está en detrimento, mientras que niveles altos de N-NO_3^- promueven su abundancia/actividad en los cultivos de arroz.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo manifiestan su agradecimiento a la investigadora Nathalia Florez, por su colaboración en el análisis estadístico y la corrección de las figuras. Así mismo, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, entidades que cofinanciaron este trabajo a través del contrato 2007B6423 161-1020/2007.

Referencias

- Abdulkadir, M., & Aminu, B. (2007). Antibacterial and antifungal effect of high pH and paraffin wax application on tomatoes, oranges and peppers. *African Journal of Biotechnology*, 6(6), 720-722.
- Acosta-Martínez V., & Tabatabai, M. A. (2000). Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, 31, 85-91.
- Allison, S. D., & Martiny, J. B. H. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105, 11512-11519.
- Allison, S. D., Hanson, C. A., & Treseder, K. K. (2007). Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1878-1887.
- Avellaneda, M. (2008). *Actividades enzimáticas de suelos con y sin historia de uso agrícola y manejo convencional y de sus consorcios bacterianos*. Tesis de Maestría en Ciencias-Química. Bogotá: Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Deng, S. P., & Tabatabai, M. A. (1997). Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biology and Fertility of Soil*, 24, 141-146.

- Dick, R. P. (1992). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry*. Long term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbiological parameters. *Agricultural Ecosystem and Environment*, 40, 25-36.
- Dick, W. A., Cheng, L., & Wang, P. (2000). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1915-1919.
- Dick, W. A., & Tabatabai, M. A. (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. In F. B. Metting (Ed.). *Soil Microbial Ecology* (pp. 95-127). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dinkelaker, B., & Marschner, H. (1992). *In vivo* demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. *Plant Soil*, 144, 199-205.
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1977). Phosphatases in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 9, 167-172.
- Fedearroz. (2000). *Manejo y conservación de suelos para la producción de arroz en Colombia*. Bogotá: Fedearroz.
- Frey-Klett, P., et al. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist*, 165, 317-328.
- Gross, M. (2009). Fears over phosphorus supplies. *Current Biology*, 20(9), R386-387.
- Gyaneshwar, P., Naresh, G., Kumar, L., Parekh, J., & Poole, P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245, 83-93.
- He, Z. L., Yang, X. E., Baligar, B. C., & Calvert, D. V. (2003). Microbiological and biochemical indexing systems for assessing quality of acid soils. *Advances in Agronomy*, 78, 89-138.
- Igual, M., Valverde, A., Cervantes, E., Velásquez, E. (2001). Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21, 561-568.
- Juma, N. G., & Tabatabai, M. A. (1988). Phosphatase activity in corn and soybean roots: conditions for assay and effects of metals. *Plant and Soil*, 107, 39-47.
- Lara, R. (2003). Las propiedades químicas del suelo y su fertilidad. En M. Triana, R. Lara, M. I. Gómez y G. Peñaloza (Eds.). *Manejo integral de la fertilidad del suelo*. Bogotá: Sociedad Colombiana de las Ciencias del Suelo.
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., & Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2407-2415.
- Li, Y-F., Luo, A-C., Wei, X-H., & Yao, X-G. (2008). Changes in phosphorus fractions, pH, and phosphatase activity in rhizosphere of two rice genotypes. *Pedosphere*, 18(6), 785-794.

- Marschner, P., Crowley, D., & Rengel, Z. (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 883-894.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-270.
- Pascual, J. A., Hernández, T., Ayuso, M., & García, Y. (1997). Changes in microbial activity of arid soils amended with urban organic wastes. *Biology and Fertility of Soils*, 24, 429-434.
- Pascual, J. A., Moreno, J. L., Hernández, T., & García, Y. (2002). Persistence of immobilized and total urease and phosphatases in a soil amended with organic wastes. *Biosources Technology*, 82, 73-78.
- Patel, K. J., Singh, A. K., Nareshkumar, G., & Archana, G. (2010). Organic acid producing phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Applied Soil Ecology*, 44, 252-261.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E. A. A., Ortiz-Urquiza, A., & Santiago-Álvarez, C. (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*, 111(8), 947-966.
- Ramírez, A. C., & Klopper, J. W. (2010). Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 835-844.
- Richardson, A. E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 897-906.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339.
- Sánchez, L. F., y Owen, E. J. (1984). Fertilización de cultivos anuales en los Llanos Orientales. Tibaitatá, *Manual de Asistencia Técnica* 27.
- Tabatabai, M., & Bremner, A. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 301-307.
- Tarafdar, J. C., Yadav, R. S., & Meena, S. C. (2001). Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164, 279-282.
- Torrent, J., Barberis, E., & Gil-Sotres, F. (2007). Agriculture as a source of phosphorus for eutrophication in southern Europe. *Soil Use Management*, 23, 25-35.

- Weyman-Kaczmarkowa, W., & Pedziwilk, Z. (2000). The development of fungi as affected by pH and type of soil, in relation to the occurrence of bacteria and soil fungistatic activity. *Microbiological Research*, 155(2), 107-112.
- Yadav, R. S., & Tarafdar, J. C. (2003). Phytase and phosphatases producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 745-751.
- Yarzabal, L. A. (2010). Agricultural development in tropical acidic soils: potential and limits of phosphate-solubilizing bacteria. In P. Dion (Ed.). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Estimación de poblaciones de microorganismos ligninolíticos y celulolíticos, y actividad β -glucosidasa en agrosistemas de arroz

Ivonne Gutiérrez-Rojas^{1, *}, Adriana Matiz-Villamil¹,
Mauricio Aguirre-Morales¹, Edgar Reyes-Pineda¹,
Sylvia Natalia Lemos-Gordo¹, Johanna Milena Méndez-Pedraza¹,
Ángela Judith Núñez-Arbeláez¹, Luz Natalia Parra-Fajardo¹,
Andrea Alfonso-Piragua¹, Diego Avendaño-Herrera¹,
Luz Marina Melgarejo², Catalina Camelo², Janeth Rodríguez³

¹ Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Bogotá, D.C.

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia

³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

• ivonne.gutierrez@javeriana.edu.co

La porción del ciclo del carbono (C) que sucede en el suelo gobierna la mayoría de los procesos agronómicos. En los agro-ecosistemas, la mayor fuente de C son las plantas, en las que el C asociado a los cultivos entra en el suelo como materia orgánica compleja en forma de tallos, hojas, raíces y exudados, seguido por las enmiendas orgánicas, como compost y estiércol. La descomposición de los residuos orgánicos es la principal función de la población microbiana del suelo; allí los microorganismos heterótrofos oxidan los compuestos carbonados obteniendo así energía para crecer, multiplicarse y sobrevivir. Los procesos de descomposición generalmente involucran un amplio espectro de microorganismos que actúan de acuerdo con el sustrato; ellos liberan enzimas para convertir compuestos de formas complejas a sustratos más simples y así ser metabolizados. Debido a estos procesos, el C presente en las estructuras vegetales se transforma progresivamente a formas oxidadas hasta dióxido de carbono (CO_2), el cual es liberado por los microorganismos del suelo a la atmósfera en un proceso conocido como respiración. Aunque la mayor parte del C es incorporado a la biomasa microbiana o liberado en forma de CO_2 (mineralización), una pequeña porción es modificada

químicamente debido a la acción microbiana y permanece en el suelo como materia orgánica) (Scow, 1997; Wagner y Wolf, 1999; Zech *et al.*, 1997).

La MO es un indicador de la calidad del suelo, tanto en sus funciones agrícolas (p. ej. producción y economía) como en sus funciones ambientales (e.g. captura de carbono y calidad del aire). La MO desempeña un papel importante en la productividad del suelo, dado que representa la mayor fuente de nutrientes para las plantas (e.g. N, P, S); también influye en las propiedades químicas y físicas del suelo, como el pH, la capacidad de intercambio iónico y la estructura del suelo; la agregación y la estabilidad del suelo aumentan con el contenido de materia orgánica, incrementando a su vez la tasa de infiltración y la capacidad de retención del agua disponible en el suelo, así como la resistencia contra la erosión hídrica y eólica. La MO puede ser dividida en dos fracciones, una fracción lábil y una fracción estable; los componentes de la primera se descomponen en pocas semanas o meses y consisten en residuos orgánicos parcialmente degradados y otras sustancias no húmicas como aminoácidos, proteínas, polisacáridos, entre otras, mientras que los componentes de la fracción estable pueden persistir por años, al ser resistentes al ataque microbiano o encontrarse físicamente protegidos por asociación con superficies minerales. Estos componentes son conocidos como material húmico (ácido húmico, ácido fúlvico y humina) (Wagner y Wolf, 1999) y consisten en macromoléculas amorfas derivadas de los precursores biogénicos, mencionados anteriormente. La humificación, así como la descomposición primaria, son procesos mediados por microorganismos y están influidos por variables específicas del sitio, tales como temperatura, régimen de agua del suelo, pH y disponibilidad de nutrientes (FAO, 2002; Scow, 1997; Wagner y Wolf, 1999; Zech *et al.*, 1997). Por todo lo anterior, los niveles de MO alcanzados en un agrosistema específico resultan dependientes, además de las variables mencionadas previamente, de la cantidad y el tipo de residuos adicionados al suelo, así como de la cantidad, diversidad y actividad de la fauna y microfauna del suelo.

La composición de los residuos vegetales depende del tipo de cultivo y de la variedad; están compuestos mayoritariamente por celulosa, seguida de hemicelulosa y lignina. Abou-El-Enina *et al.* (1999) compararon la composición química de 53 variedades de arroz, encontrando un contenido de celulosa y hemicelulosa entre 56,55 % a 68,57 %, siendo mayor el porcentaje de celulosa; el contenido de lignina fue < 4,9 %, con una media de 4,07 %, y un contenido de nitrógeno entre 0,44 % y 0,86 %. El porcentaje de cenizas obtenido fue de 15,32 % a 23,82 % y el porcentaje de silicio entre 10,33 % a 17,74 %. De los macronutrientes, el potasio (K) fue el que se halló en mayor cantidad, con un promedio de 1,89 %, seguido de magnesio (Mg) 0,32%, calcio (Ca) 0,17 % y fósforo (P) 0,047 %.

Celulosa, hemicelulosa y lignina

La celulosa y la hemicelulosa son macromoléculas construidas de diferentes azúcares, cuya composición y proporción varía según la especie de planta (Sánchez, 2009). La celulosa es un polímero no ramificado formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4 (Ahmed *et al.*, 2001; Lasheras, 2004; Sánchez, 2009). La hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo, el cual presenta una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas que contienen habitualmente glucosa o xilosa. La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas llamadas celulasas. El sistema de celulasas típico incluye tres tipos de enzimas: la endo β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.6), que ataca los enlaces β -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos); la exo β -1,4-glucanasa (E.C.3.2.1.91), que separa el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula, y la β -glucosidasa (E.C.3.2.1.21), que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (Ahmed *et al.*, 2001; Sánchez, 2009).

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos; sin embargo, solo algunos de ellos son capaces de hidrolizar la celulosa por completo. Los más eficientes degradadores de celulosa, los hongos filamentosos *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa. Otros microorganismos productores de celulasas incluyen hongos aeróbicos termofílicos (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* y *Humicola insolens*), hongos anaeróbicos mesofílicos (*Neocallimastix frontales*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*), bacterias aeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Bacillus sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Microbispora bispora* y *Thermomonospora sp.*) y bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*) (Ahmed *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2003; Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005; Sánchez, 2009).

Por otro lado, la lignina es un polímero sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides, que se une a la celulosa y a la hemicelulosa haciendo de la pared celular de las plantas una barrera física prácticamente impenetrable, dando soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Sánchez, 2009). La degradación de la lignina es un prerrequisito para la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa; los microorganismos no ganan energía de la degradación de la lignina, pero les permite el acceso a estos polisacáridos (Tuomela, 2002), que son las principales fuentes de energía para ellos y para otros microorganismos que no son

capaces de degradarla. Además, la estructura compleja y aleatoria de la lignina, la hidrofobicidad y la carencia de enlaces fácilmente hidrolizables hacen que este polímero sea difícilmente degradado por la mayoría de los microorganismos. Los únicos microorganismos conocidos que degradan la lignina eficientemente hasta CO_2 y H_2O son los hongos de la podredumbre blanca, de los cuales los más estudiados han sido *Botrytis cinerea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stropharia coronilla*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* (Howard *et al.*, 2003; Sánchez, 2009; Swamy y Ramsay, 1999; Ullah *et al.*, 2000). Otros grupos como algunos deuteromycetes, e.g. *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* y *Penicillium spp* (Ortiz-Moreno y Uribe-Vélez, 2010), y algunas pocas especies de los géneros bacterianos, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Tuomela, 2002), poseen la capacidad de llevar a cabo la oxidación parcial de la lignina, permitiendo la formación de ácidos húmicos y fúlvicos que mejoran la estructura del suelo. La lignina no puede ser degradada por una sola enzima; se requieren múltiples enzimas. Las enzimas fúngicas usadas son las polifenol oxidasas (lacasas) y peroxidasas, tales como la lignina peroxidasa y peroxidasa dependiente de Mn (Glazer y Alexander, 1998; Howard *et al.*, 2003; Sánchez, 2009; Tuomela, 2002). En la figura 5.1 se muestra un esquema de la vía metabólica utilizada por varios de los hongos de podredumbre blanca.

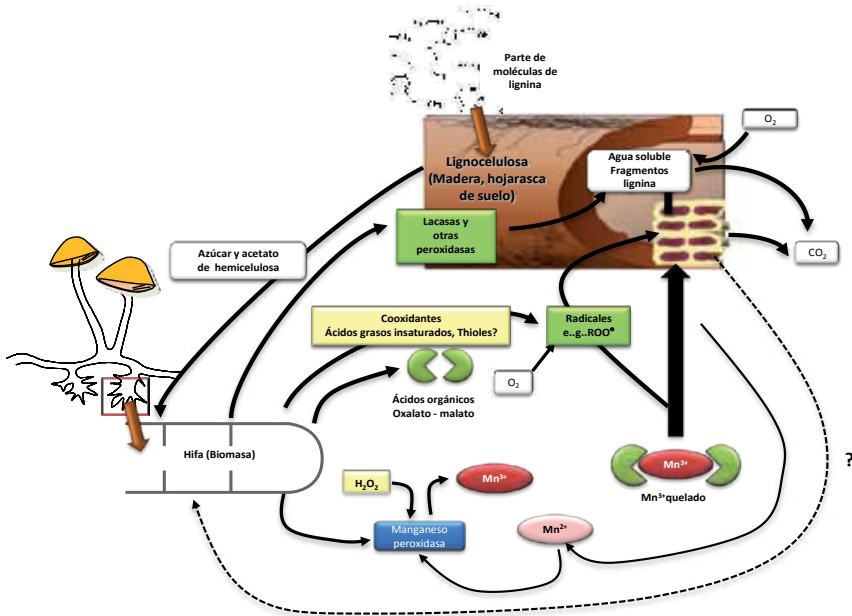


Figura 5.1 Degradación de lignina por hongos.

Fuente: adaptada de Hofrichter (2000).

Estimación de poblaciones microbianas con actividad ligninolítica y celulolítica en cultivos de arroz

La diversidad y la actividad de los microorganismos en el suelo determinan en alto grado la eficiencia de un agrosistema, en este caso específico, en el ciclaje del C. En el presente trabajo se cuantificaron en suelos de cultivos de arroz las poblaciones de bacterias y hongos degradadores de celulosa y hemicelulosa, llamados genéricamente como celulolíticos y hongos degradadores de lignina, ligninolíticos, grupos clave en los procesos de descomposición primaria y humificación. Para esto, se seleccionaron 16 fincas arroceras (capítulo 2), ocho fincas del departamento de Tolima y ocho fincas del departamento de Meta (doce cuentan con un sistema de producción inundado por riego y cuatro emplean el sistema seco), las cuales fueron evaluadas durante el primer período de siembra de los años 2008 y 2009.

Para el conteo de bacterias con actividad celulolítica, se pesaron 10 g de suelo y se disolvieron en 90 mL de solución salina estéril al 0,85 % (p/v); posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-6} . De las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , 0,1 mL se sembraron por superficie en agar celulosa al 1 % (p/v)¹. Las cajas fueron incubadas a 28 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó a las colonias presentes en los medios colorante rojo congo al 1 % (p/v) como revelador, luego de quince minutos se retiró el exceso y se adicionó NaCl 0,1 M, dejando reposar por quince minutos más; al cabo de este tiempo se hizo el recuento de las colonias que presentaron halos de hidrólisis (Páez *et al.*, 2001). Para el recuento de hongos con actividad celulolítica, 0,1 mL de las mismas diluciones se sembraron por superficie en agar celulosa al 1 % (p/v) adicionado con cloranfenicol (100 mgL⁻¹) y penicilina (60 mgL⁻¹), se incubaron a 28 °C por 7 días y se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Para hongos ligninolíticos, 0,1 mL de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} (preparadas como se indicó anteriormente), fueron sembrados en agar lignina²; las cajas fueron incubadas a 28 °C por 7 días; transcurrido este tiempo se hizo el recuento de las colonias que presentaron actividad, entendida esta como la presencia de un halo de color marrón

-
- 1 Composición en gL⁻¹: Celulosa, 10; extracto de levadura, 2,5; peptona universal, 2,5; sulfato de amonio, 0,5; cloruro de calcio, 0,5; fosfato monobásico de potasio, 0,1; fosfato dibásico de potasio, 0,1; agar, 15; pH final 7,0+/- 0,2.
 - 2 Composición en gL⁻¹: Lignina alcalina, 1; fosfato dibásico de potasio, 0,5; sulfato de magnesio heptahidratado, 0,2; nitrato de amonio, 0,1; cloruro de potasio, 0,1; sulfato de hierro heptahidratado, 0,02; nitrato de calcio tetrahidratado, 0,05; extracto de malta, 2; agar, 15. Soluciones: KOH 1 M 5 ml L⁻¹, guayacol 0,4 ml L⁻¹, dioxano 10 ml L⁻¹. Antibióticos: clorotetraciclina 60 mL⁻¹, sulfato de estreptomina 30 mg L⁻¹ y penicilina G 30 mg L⁻¹

alrededor de las colonias, debido a la oxidación del guayacol presente en el medio (Kiiskinen *et al.*, 2004; Thorn *et al.*, 1996).

En las figuras 5.2 y 5.3 se muestran los resultados promedio obtenidos para bacterias y hongos celulolíticos en las 16 fincas evaluadas, para los dos años de estudio. En general, los recuentos para bacterias celulolíticas (figura 5.2) se encuentran en un rango entre $5,23 \pm 0,40$ (finca 7 - año 1) y $7,67 \pm 0,03$ (finca 8 - año 2) $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ (gramo de suelo seco), con una media de

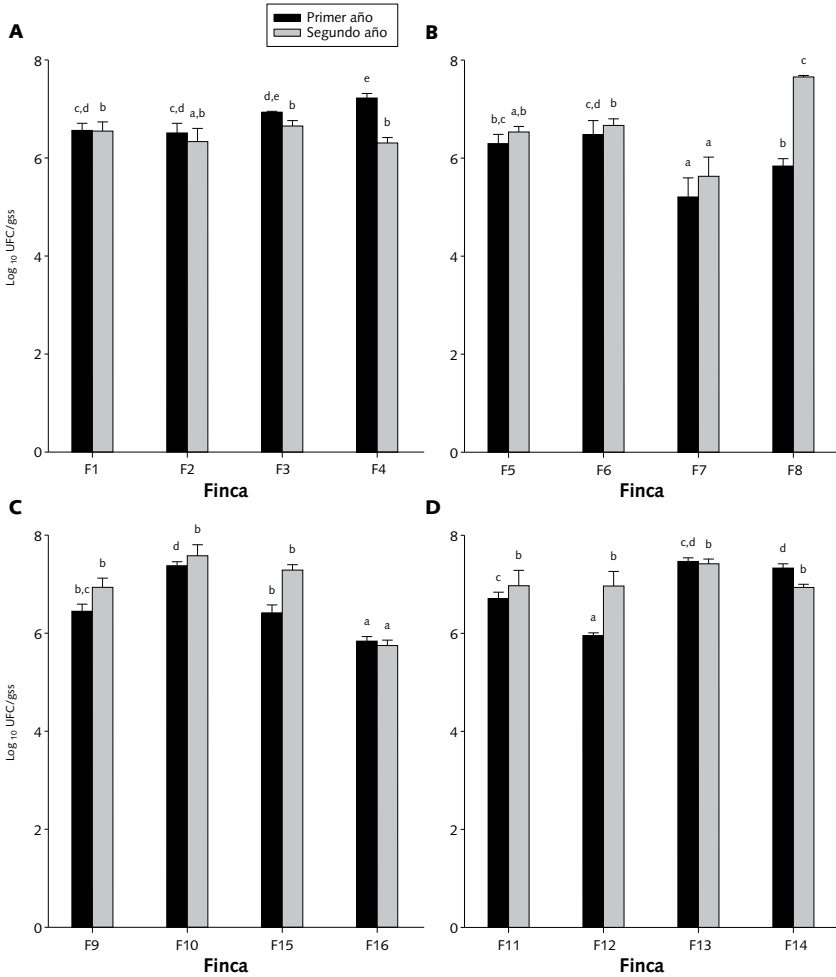


Figura 5.2 Promedio del recuento de bacterias celulolíticas ($n = 3$). A) Tolima norte. B) Tolima sur. C) Meta seco. D) Meta inundado. Las ocho fincas de Tolima y las fincas 11, 12, 13 y 14 de Meta tienen sistema de cultivo de inundación, mientras que las fincas 9, 10, 15 y 16 están bajo el sistema de cultivo seco. Las letras diferentes representan diferencias de acuerdo con la prueba de Tukey con un $P > 0,05$. La prueba fue realizada por separado para el primer y segundo año.

6,65 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$. En cuanto a los hongos celulolíticos (figura 5.3), el rango se encuentra entre $3,92 \pm 0,18$ (finca 5 - año 1) y $5,47 \pm 0,05$ (finca 15 - año 2) $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, con una media de $5,00 \text{ Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$. En general, se observa que los recuentos de bacterias celulolíticas son de 1 a 2 unidades logarítmicas más altos que los de hongos celulolíticos, resultado esperado para las comunidades microbianas en suelo (Bigelow *et al.*, 2002). En cuanto a los resultados obtenidos para hongos ligninolíticos (figura 5.4), no se obtuvieron recuentos

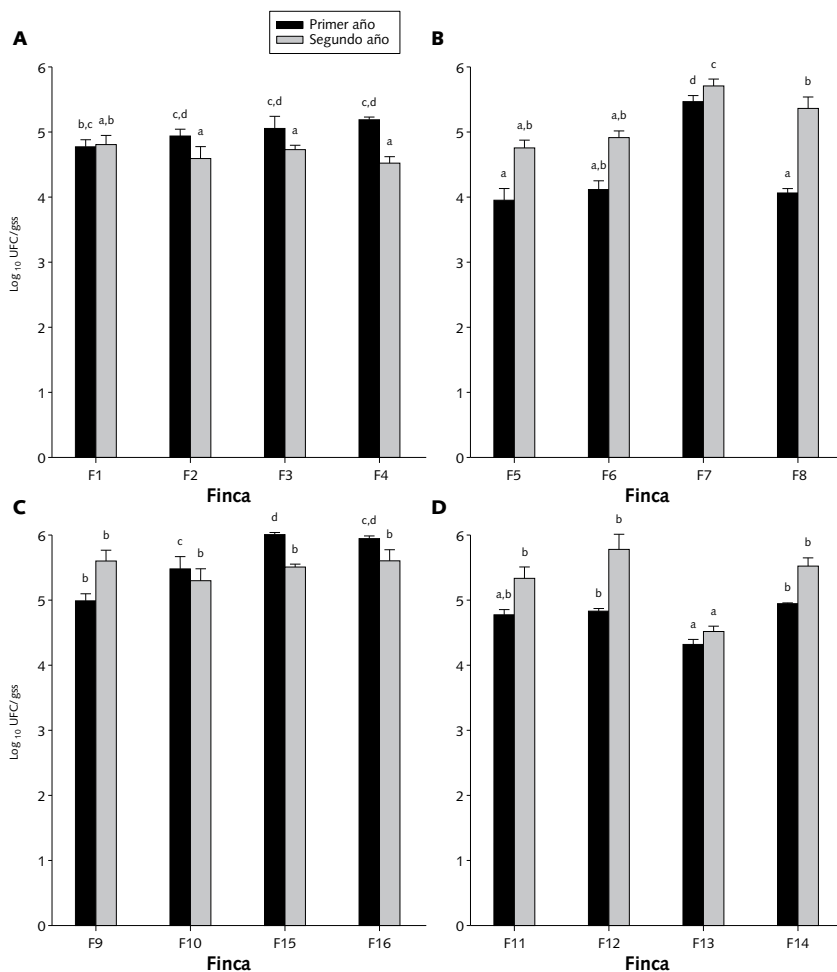


Figura 5.3 Promedio del recuento de hongos celulolíticos (n = 3). A) Tolima norte. B) Tolima sur. C) Meta seco. D) Meta inundado. Las ocho fincas de Tolima y las fincas 11, 12, 13 y 14 de Meta tienen sistema de cultivo de inundación, mientras que las fincas 9, 10, 15 y 16 están bajo el sistema de cultivo seco. Las letras diferentes representan diferencias de acuerdo con la prueba de Tukey con un $P > 0,05$. La prueba fue realizada por separado para el primer y segundo año.

para las fincas 9, 10, 12, 14 y 15 - año 1, ni para las 2, 7, 13, 15 y 16 - año 2; para las demás fincas los rangos oscilaron entre $0,73 \pm 0,60$ (finca 6 - año 1) y $3,84 \pm 0,05$ (finca 7 - año 1) $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, con una media de $2,29 \text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en el presente estudio para bacterias y hongos celulolíticos con lo encontrado por otros autores, se observa que los recuentos se hallan dentro de los rangos reportados para este

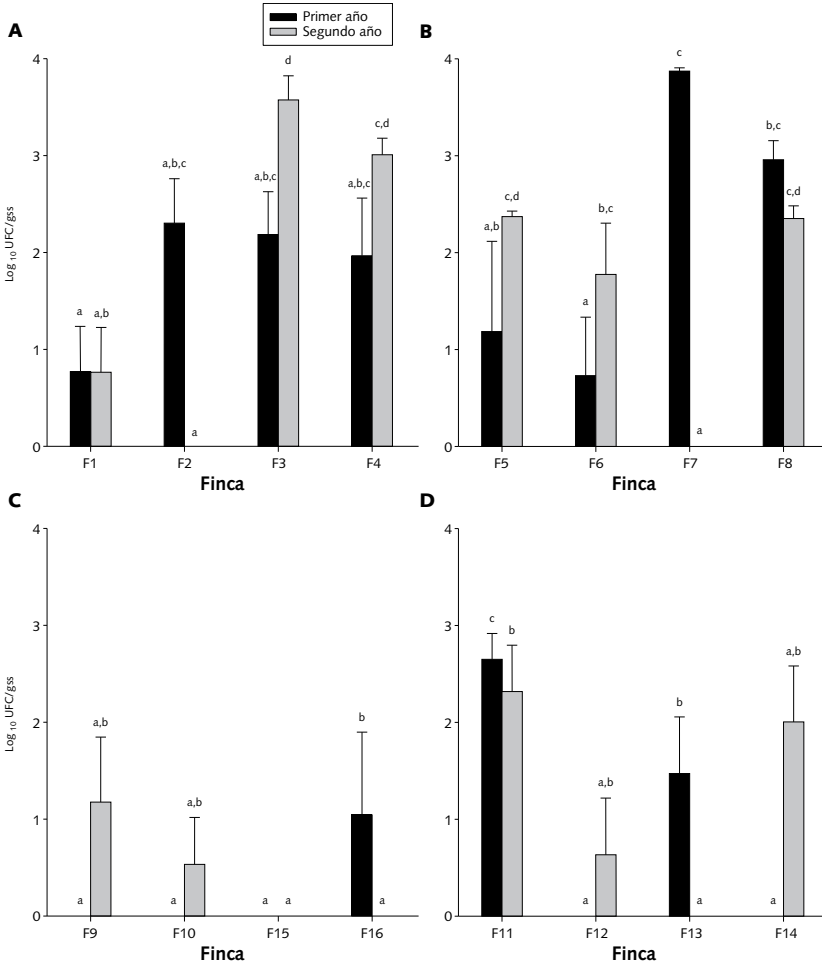


Figura 5.4 Promedio del recuento de hongos ligninolíticos ($n = 3$). A) Tolima norte. B) Tolima sur. C) Meta seco. D) Meta inundado. Las ocho fincas de Tolima y las fincas 11, 12, 13 y 14 de Meta tienen sistema de cultivo de inundación, mientras que las fincas 9, 10, 15 y 16 están bajo el sistema de cultivo seco. Las letras diferentes representan diferencias de acuerdo con la prueba de Tukey con un $P > 0,05$. La prueba fue realizada por separado para el primer y segundo año.

tipo de microorganismos. Aon *et al.* (2001) reportaron en suelos agrícolas poblaciones de bacterias entre 6,47 y 6,90 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$ y entre 4,70 y 5,87 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$ para hongos. Otros autores, en suelos de bosques, han reportado poblaciones (sin diferenciar bacterias de hongos) entre 6,2 a 8,6 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, con variaciones hasta de una unidad logarítmica para diferentes períodos estacionales (Yang *et al.*, 2003); entre 5,40 a 7,2 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$ para suelos de sabana, en donde las menores poblaciones corresponden a suelos altamente degradados por sobrepastoreo y las mayores a suelos en recuperación sin pastoreo por al menos 20 años (Abril y Bucher, 1999). En suelos de cultivos de arroz, Morales *et al.* (2004) reportaron una población promedio de 6,62 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, la que consideraron ligeramente mayor (diferencia no significativa estadísticamente) a la que se obtuvo en suelos cultivados con café (6,36 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$) y pastizales (6,59 $\text{Log}_{10}\text{UFC.g}^{-1}$). En cuanto a los hongos ligninolíticos, no fue posible comparar los resultados del presente estudio puesto que no existen reportes de estimación de poblaciones de estos microorganismos en ningún tipo de suelo; sin embargo, el no crecimiento en el medio específico y los bajos recuentos obtenidos (en los casos en que se obtuvo crecimiento), corresponden a lo esperado debido a la complejidad del sustrato lignina, lo que conlleva a que pocos géneros de microorganismos sean capaces de degradarlo.

Las poblaciones de microorganismos celulolíticos y ligninolíticos presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre fincas (figuras 5.2, 5.3 y 5.4), y con el fin de analizar si se da una distribución de estos microorganismos por zona geográfica o por sistema de cultivo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para cada año entre los recuentos obtenidos, los parámetros fisicoquímicos evaluados en los análisis de suelos y las 16 fincas muestreadas (figura 5.5). Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson para establecer las correlaciones existentes entre los parámetros fisicoquímicos evaluados y los recuentos de bacterias, hongos celulolíticos y hongos ligninolíticos, cuyos resultados se presentan en la tabla 5.1.

Los resultados del PCA muestran una clara separación por zonas de muestreo (Tolima y Meta). Para el caso de Tolima, incluso se separan en Tolima norte y Tolima sur, lo cual está dado básicamente por las características de los suelos, tal como se analizó en el capítulo 2. En cuanto a los recuentos de microorganismos celulolíticos, se observa que para el primer año existe correlación positiva (aunque no estadísticamente significativa) entre los recuentos de bacterias y hongos celulolíticos, con los contenidos de MO y NT, mientras que para el segundo año se mantiene la correlación positiva entre hongos y bacterias celulolíticas, pero se observa correlación negativa con los contenidos de MO y NT, siendo estadísticamente

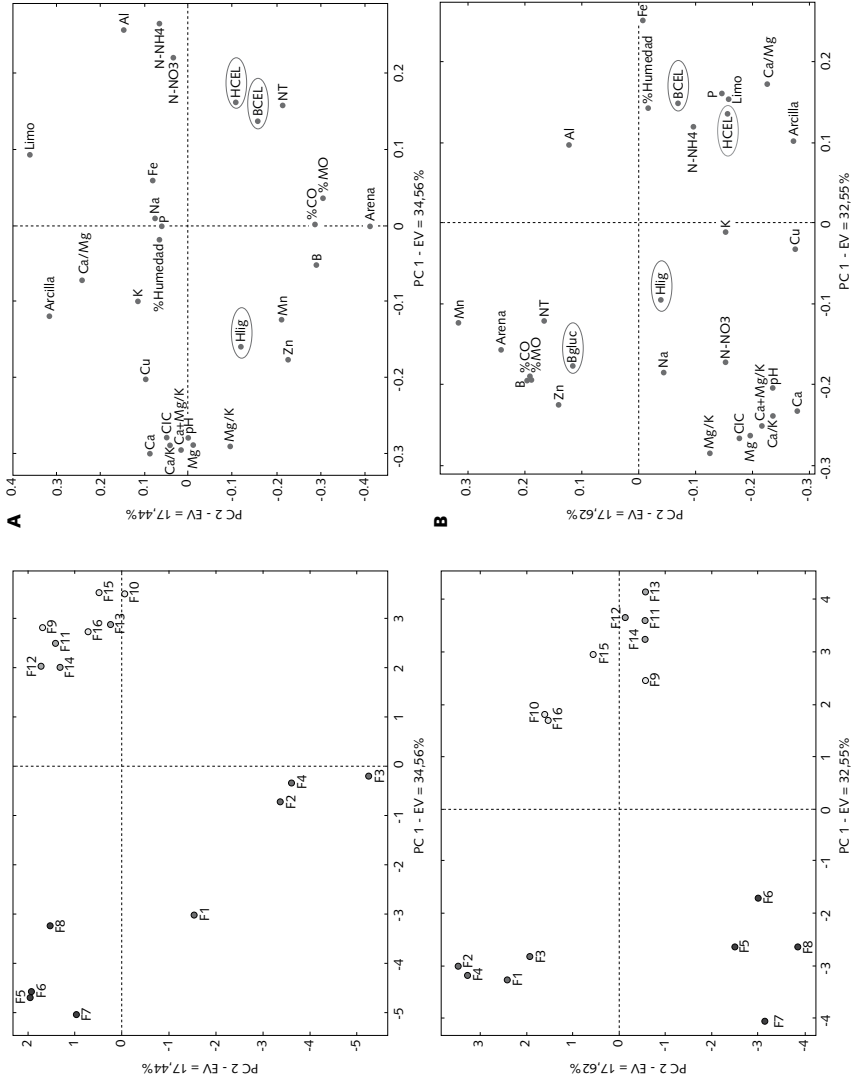


Figura 5.5 Análisis de componentes principales para fincas arroceras de Tolima y Meta. Relaciones entre las fincas, los parámetros fisicoquímicos y los parámetros biológicos (BCEL; Bacterias celulolíticas; HCEL; Hongos celulolíticos; Hlign; Hongos ligninolíticos; Bgluc; actividad de β -glucosidasa). A) Primer año. B) Segundo año.

Tabla 5.1 Correlaciones entre los parámetros físico-químicos y los recuentos de microorganismos celulolíticos y ligninolíticos (solo se muestran las correlaciones significativas). Coeficientes de correlación de Pearson.

Parámetros	Bacterias celulolíticas		Hongos celulolíticos		Hongos ligninolíticos	
	Primer año	Segundo año	Primer año	Segundo año	Primer año	Segundo año
% MO		-0,436 ^b				
pH			-0,508 ^a		0,548 ^b	0,455 ^a
Ca	-0,484 ^b		-0,435 ^b		0,432 ^a	
Mg	-0,468 ^b	-0,443 ^b	-0,434 ^b		0,494 ^a	
K	-0,460 ^b			0,455 ^b		
Mg/K						
CIC	-0,428 ^b				0,433 ^a	
Cu	-0,495 ^b					
B		-0,490 ^b				
Al			0,464 ^b		-0,469 ^a	
Fe			-0,498 ^a			
Mn				-0,513 ^a		
Zn					0,429 ^a	
N-NH ₄ ⁺	0,496 ^b					
Limo					-0,465 ^a	

^a Correlación significativa con un $p < 0,05$
^b Correlación significativa con un $p < 0,10$
Fuente: autores

significativa en algunos casos, comportamiento exactamente opuesto al observado en el año 1 (tabla 5.1).

Este comportamiento de las bacterias y hongos celulolíticos respecto al contenido de MO no es sorprendente, ya que los microorganismos celulolíticos y ligninolíticos son particularmente sensibles a los cambios en la disponibilidad y tipo de fuente de C, el cual puede llegar al suelo a través de exudados de la raíz, siendo estos compuestos de bajo peso molecular, tales como azúcares simples (e.g. glucosa, fructosa), aminoácidos (e.g. glicina, alanina) y ácidos carboxílicos (e.g. ácido cítrico, ácido láctico) (Eilers *et al.*, 2010), o a través de residuos de las plantas, tales como tallos, hojas y raíces. Por esta razón, el tipo, la cantidad y el manejo dado a los residuos de cosecha son factores determinantes en la dinámica de las poblaciones de estos microorganismos en el suelo. En el cultivo del arroz, además de la quema de los residuos y del pastoreo antes de la siembra, existen básicamente dos prácticas para su manejo: a) Después de la cosecha, los residuos son dejados en el campo y este es arado inmediatamente después; b) Los campos no son arados sino en el inicio de la siguiente cosecha (Devevre y Horwáth, 2000).

Se ha demostrado que utilizar una u otra práctica influye en las poblaciones de los microorganismos que degradan tales residuos. En la primera práctica, los residuos son fragmentados e incorporados al suelo en

condiciones aerobias, debido a que se incorpora oxígeno al suelo durante el procedimiento, lo que lleva a un aumento de la población de microorganismos celulolíticos aerobios, aceleración de la descomposición y aumento de la mineralización. En el segundo caso, los tallos y las raíces quedan intactos, haciendo que la descomposición sea extremadamente lenta; este tipo de residuos es más difícil de degradar, especialmente las raíces por su alto contenido de lignina. Esta circunstancia lleva a una limitación nutricional para los microorganismos que no son capaces de degradar tales compuestos; como consecuencia, las poblaciones microbianas son más bajas y, por ende, la tasa de mineralización del C también es baja (Devevre y Horwáth, 2000; Lu *et al.*, 2003).

Para los cultivos de arroz inundados, otro factor determinante en las poblaciones microbianas, en general, y la de microorganismos ligninolíticos y celulolíticos, en particular, es el tiempo que permanecen los residuos en el suelo antes de la inundación. Cuando los campos de cultivo son inundados y los residuos permanecen sin degradar o parcialmente degradados, continúa la degradación de los polisacáridos por vía anaeróbica por la acción de las bacterias fermentativas, las cuales secretan enzimas que hidrolizan los polisacáridos y convierten los azúcares resultantes en alcohol, ácidos grasos e hidrógeno (Liesack *et al.*, 2000). En presencia de aceptores alternativos de electrones, estos sustratos son degradados completamente hasta CO_2 , y bajo limitación de estos, las bacterias sintróficas degradan los alcoholes y ácidos grasos a acetato, formato y CO_2 . El acetato y el formato sirven finalmente como sustratos para las arqueobacterias metanogénicas. Una ruta alternativa es la conversión directa de los monómeros (por ejemplo, azúcares) a acetato, por las bacterias homoacetogénicas; el acetato también sirve como sustrato para las metanógenas acetotróficas, convirtiéndolo en CH_4 y CO_2 , los que finalmente salen del sistema a través del agua lixiviada hacia el subsuelo y por flujo hacia la atmósfera (Kimura *et al.*, 2004, Liesack *et al.*, 2000). Numerosos estudios (Bosse y Frenzel, 1998; Devevre y Horwáth, 2000; Gon y Neue, 1996; Johnson *et al.*, 2006; Sass *et al.*, 1991; Yagi *et al.*, 1990) han mostrado que la incorporación de los residuos de cosecha al campo aumenta hasta cinco veces la emisión de CH_4 , haciendo del cultivo del arroz en campos inundados una de las más importantes fuentes antropogénicas de emisiones de metano a la atmósfera.

Es evidente que el tipo y la cantidad de residuos, el manejo que se da a estos, el tiempo que permanecen en el suelo y el ambiente en el cual se da la descomposición (temperatura, humedad, niveles de oxígeno, entre otros), son factores no controlados bajo las condiciones de este estudio, que influyen en gran medida en el número y la diversidad de las poblaciones de microorganismos celulolíticos y ligninolíticos. Este comportamiento es más evidente en algunas fincas; por ejemplo, las fincas 7 y 8 que presentan los contenidos

más bajos de carbono orgánico para el año 1 (1,47 y 1,27 %, respectivamente), muestran los valores más bajos de bacterias celulolíticas y los más altos de hongos ligninolíticos, sugiriendo que en estas fincas se debe estar favoreciendo la degradación de los compuestos más recalcitrantes de la MO en relación con las otras fincas analizadas, producto de los menores contenidos de MO.

Hasta el momento se ha hablado del C como factor determinante en la cantidad y composición de las poblaciones de microorganismos celulolíticos y ligninolíticos en el suelo. Sin embargo, otros factores como los microelementos ejercen una marcada influencia sobre ellas. En la tabla 5.1 se observa que en el primer año de muestreo se presentaron correlaciones negativas y positivas de Ca y Mg frente a las poblaciones de microorganismos celulolíticos y ligninolíticos. En cuanto al Ca, para bacterias celulolíticas se halló un $r = -0,484$ y un $p = 0,058$; para hongos celulolíticos se observó un $r = -0,435$ y un $p = 0,092$, mientras que estos mismos parámetros, también en el primer año de muestreo, se relacionaron de manera positiva en los hongos ligninolíticos, presentando un $r = 0,432$ y un $p = 0,095$. En cuanto al Mg para bacterias celulolíticas, se halló un $r = -0,468$ y un $p = 0,068$; para hongos celulolíticos se observó un $r = -0,434$ y un $p = 0,093$, mientras que este mismo parámetro se relacionó de manera positiva, también en el primer año de muestreo, en los hongos ligninolíticos, presentando un $r = 0,494$ y un $p = 0,052$, con un 90 % de significancia en todos los casos. Estos resultados confirman que las diferencias de disponibilidad de nutrientes manifestadas en los cultivos de arroz ejercen influencia positiva o negativa en las poblaciones presentes. Estas características son importantes porque los cationes como Ca y Mg desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y la actividad enzimática, especialmente en los hongos. El Ca es esencial para la estabilidad de las membranas, mientras el Mg es un cofactor para muchas enzimas. En los hongos, el sistema de secreción de enzimas celulolíticas requiere la activación de la calmodulina, la cual es una proteína efectora cuya actividad depende de la concentración de Ca en el medio; el Ca también es importante en la morfogénesis de los hongos y en el crecimiento de las hifas. Por su parte, el magnesio, que es considerado un macronutriente para los hongos, es un cofactor esencial para la síntesis de la pared celular, para la utilización del ATP, la reparación del ADN y muchas otras reacciones metabólicas (Jellison *et al.*, 1997).

Para los hongos ligninolíticos, los menores recuentos se observan en las ocho fincas de Meta, independientemente del sistema de cultivo, tanto para el año 1 como para el año 2. Según los resultados del PCA (figura 5.5), esta tendencia puede deberse a los altos contenidos de Al en estos suelos, comportamiento mucho más evidente para el año 2 (figura 5.5b). Así como el Al es tóxico para las plantas, puede serlo para algunos grupos de microorganismos, mientras que otros son capaces de desarrollar mecanismos para

tolerar altas concentraciones de este, lo que selecciona de alguna manera las comunidades microbianas en el suelo (Jorquera *et al.*, 2010), llevando a una disminución de las comunidades de hongos en la rizósfera (Devevre *et al.*, 1996). En el presente estudio se observa el efecto sobre las poblaciones de hongos ligninolíticos, pero no sobre la de los hongos celulolíticos; esto se puede deber probablemente a que la diversidad de los ligninolíticos es mucho menor que la de los celulolíticos, así que la presión de selección es mucho mayor para los primeros que para los segundos, lo que podría afectar el flujo de C en estos suelos.

Todos los factores abióticos (temperatura, pH, humedad, estructura, tamaño de partícula, carbono orgánico, nitrógeno, concentración de microelementos, entre otros) se integran en el suelo, logrando de esa manera una influencia marcada sobre las poblaciones microbianas. Sin embargo, aún no se ha entendido del todo la respuesta fisiológica de las poblaciones microbianas a los cambios en estos factores abióticos, y de alguna manera continúa siendo una “caja negra” en la cual los microorganismos actúan como catalizadores en muchas reacciones bioquímicas, siendo a su vez influidos por factores externos. Además, no solamente los factores abióticos, sino también los factores bióticos (interacciones dadas entre los miembros de dichas comunidades) son factores relevantes en la definición de estas reacciones bioquímicas (Cleveland *et al.*, 2007). Así, pues, no es posible explicar la dinámica de estas poblaciones únicamente a través de los parámetros fisicoquímicos evaluados en los análisis de suelo, tal como se observa en los resultados del análisis de correlación.

Actividad enzimática β -glucosidasa en suelos en cultivos de arroz inundado y seco

Existe gran interés en el uso de la actividad enzimática en el suelo, como indicador biológico de la calidad del mismo, debido a su determinación relativamente simple, a su significado ecológico y a su alta sensibilidad al estrés ambiental o a cambios en el manejo del suelo (Bandick y Dick, 1999; Lammirato *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2002). De todas las enzimas presentes en el suelo, son de particular interés para este estudio las involucradas en la degradación de MO, y de estas, la β -glucosidasa (E.C.3.2.1.21), ya que su actividad puede ser un paso limitante en la degradación de celulosa (Turner *et al.*, 2002), lo que sugiere una fuerte correlación entre su actividad y la biodisponibilidad de C en el suelo (Cañizares *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, además de estimar las poblaciones de bacterias y hongos celulolíticos, se determinó la actividad β -glucosidasa (figura 5.6), por ser esta una enzima extracelular producida por bacterias y hongos del suelo que posee gran incidencia en el ciclo del carbono (Yan *et al.*, 2010). Para su determinación se utilizó la metodología descrita por Avellaneda (2008),

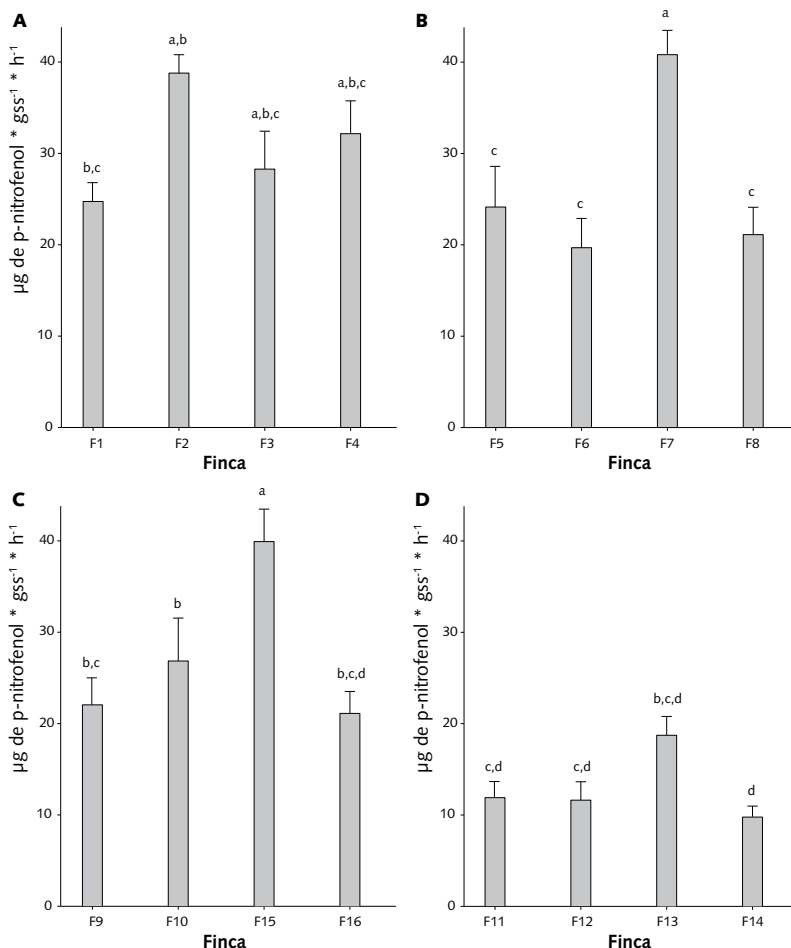


Figura 5.6 Actividad β -glucosidasa, muestreo segundo año ($n = 3$). A) Tolima norte. B) Tolima sur. C) Meta seco. D) Meta inundado. Las ocho fincas de Tolima y las fincas 11, 12, 13 y 14 de Meta tienen sistema de cultivo de inundación, mientras que las fincas 9, 10, 15 y 16 están bajo el sistema de cultivo seco. Las letras diferentes representan diferencias de acuerdo con la prueba de Tukey con un $P > 0,05$. La prueba fue realizada por separado para el primero y segundo año.

Fuente: autores

la cual es una adaptación del método propuesto por Tabatabai y Bremner (1969). El principio de este método se basa en la determinación del p-nitrofenol liberado por la enzima tras una hora de incubación a 37°C , bajo condiciones de pH controlado. El p-nitrofenol se determina colorimétricamente a 400 nm . El sustrato empleado para el análisis de la enzima es p-nitrofenil- β -D-glucósido.

Los resultados de actividad β -glucosidasa (figura 5.6) se encuentran en el rango de $9,78 \pm 0,99$ (finca 14) y $40,70 \pm 2,64 \mu\text{g de p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$

(finca 7). Los resultados son significativamente menores a los reportados en la literatura para suelos cultivados con arroz y, en general, para otros tipos de suelos. Wang y Lu (2006) estudiaron la actividad β -glucosidasa en doce suelos cultivados con arroz en una zona altamente productiva de China, encontrando un rango de actividad entre 52,68 a 137,02 μg de p-nitrofenol. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Trasar-Cepeda *et al.* (2000), en suelos cultivados con roble, reportaron actividades β -glucosidasa de 0,67 a 4,58 μmol de p-nitrofenol. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (equivalente a un rango entre 93,13 a 636,62 μg de p-nitrofenol. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Eivazi y Tabatabai (1998), en siete suelos con contenido de C orgánico entre 5 y 55 mg C.g^{-1} , midieron actividades β -glucosidasa entre 0,4 a 3,78 μmol de p-nitrofenol. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (equivalente a un rango entre 55,6 y 525,42 μg de p-nitrofenol. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Bandick y Dick (1999), en suelos de diferentes cultivos con contenidos de MO entre 23 y 41 mg C.g^{-1} y bajo diferentes condiciones de aplicación de fertilizantes, midieron actividades entre 0,29 y 2,11 μmol de p-nitrofenol. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (equivalente a 40,31 a 293,29 μg de p-nitrofenol. $\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

En la tabla 5.2 se observan, en general, correlaciones negativas de la actividad β -glucosidasa con los diferentes parámetros evaluados en este estudio. Solo se obtuvo correlación positiva con el Mn; tampoco se obtuvo correlación entre la actividad de la enzima y los recuentos de los microorganismos analizados previamente. Los ensayos enzimáticos, con frecuencia, no correlacionan con los recuentos microbianos y no predicen la disponibilidad de nutrientes para las plantas; esto debido a la gran variedad de factores (ambientales y características del suelo) que pueden afectar a las comunidades microbianas (Knight y Dick, 2004).

Tabla 5.2 Correlaciones entre los parámetros físicos y químicos, los recuentos de las poblaciones de bacterias y hongos celulolíticos y hongos ligninolíticos con los resultados de la actividad de β -glucosidasa para el segundo año de muestreo. (Para los parámetros fisicoquímicos solo se muestran las correlaciones significativas).

Parámetro	Coefficientes de correlación de Pearson
Mg	-0,467 ^b
Ca/Mg	-0,702 ^a
CIC	-0,441 ^b
P	-0,437 ^b
Fe	-0,485 ^b
Mn	0,434 ^b
Zn	-0,614 ^a
NT	0,465 ^b
N-NO ₃	0,548 ^a
Bacterias celulolíticas	-0,335
Hongos celulolíticos	-0,196
Hongos ligninolíticos	-0,273

^a Correlación significativa con un $p < 0,05$

^b Correlación significativa con un $p < 0,10$

Fuente: autores

Los resultados encontrados indican que la actividad β -glucosidasa en los suelos de las fincas muestreadas presentan variación, la cual depende probablemente del manejo, sistema de cultivo y tipo de suelo, similar a lo reportado en otros estudios (Kandeler *et al.* (2001). Adicionalmente, la baja actividad enzimática encontrada probablemente se debe a que los suelos evaluados en este estudio muestran bajo contenido de materia orgánica (capítulo 2) como se reporta en los estudios arriba mencionados. También se ha reportado que la β -glucosidasa refleja el estado de descomposición de la MO y que pertenece al grupo de enzimas que cataliza la conversión hidrolítica de la celulosa a glucosa, fuente de alimento de los microorganismos del suelo (Knight y Dick, 2004); en consecuencia, es probable que el comportamiento de la actividad de la β -glucosidasa sea indicativo de la baja descomposición de la MO en los suelos analizados.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que:

1. Las poblaciones de los microorganismos celulolíticos, para las 16 fincas arroceras evaluadas (bacterias celulolíticas, 6,65 Log₁₀UFC.g⁻¹ en promedio y hongos celulolíticos, 5,00 Log₁₀UFC. g⁻¹ en promedio) están dentro del rango reportado por otros autores en estudios similares. Por otra parte, de acuerdo con nuestra revisión bibliográfica, este es el primer reporte de poblaciones cultivables de hongos ligninolíticos, los cuales se encontraron en 2,29 Log₁₀UFC.g⁻¹ en promedio, en las zonas bajo estudio. Para el caso de las bacterias y los hongos celulolíticos, los factores más importantes para su distribución en los ambientes evaluados son el contenido de MO y NT en estos suelos. Adicionalmente, su distribución se ve afectada por el Ca y Mg.
2. La baja actividad enzimática de la β -glucosidasa probablemente se debe a que los suelos evaluados en este estudio presentan bajos contenidos de materia orgánica, lo que sugiere que es necesario incorporar mayor materia orgánica en los suelos.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo manifiestan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, entidades que cofinanciaron este trabajo a través del contrato 2007B6423 161-1020/2007.

Referencias

Abou-El-Enina, O. H, Fadelb, J. G., & MacKill, D. J. (1999). Differences in chemical composition and fibre digestion of rice straw with, and without, anhydrous

- ammonia from 53 rice varieties. *Animal Feed Science and Technology*, 79, 129-136.
- Abril, A., & Bucher, E. (1999). The effects of overgrazing on soil microbial community and fertility in the Chaco dry savannas of Argentina. *Applied Soil Ecology*, 12, 159-167.
- Ahmed, Z., Banu, H., Rahman, M., Akhter, F., & Haque, S. (2001). Microbial activity on the degradation of lignocellulosic polysaccharides. *Journal of Biological Sciences*, 1, 993-997.
- Aon, M., Cabello, M., Sarena, D., Colaneri, A., Franco, M., Burgos, J., y Cortassa, S. (2001). Spatio temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18, 239-254.
- Avellaneda, L. (2008). *Actividades enzimáticas de suelos con y sin historia de uso agrícola y manejo convencional y de sus consorcios bacterianos*. Tesis de Maestría. Bogotá: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Bandick, A. K., & Dick, R. P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*. 31, 1471-1479.
- Bigelow, C., Bowman, D., & Wollum, A. (2002). Characterization of Soil Microbial Population Dynamics in Newly Constructed Sand-Based Rootzones. *Crop Science*, 42, 1611-1614.
- Bosse, U., & Frenzel P. (1998). Methane emissions from rice microcosms: the balance of production, accumulation and oxidation. *Biogeochemistry*, 41, 199-214.
- Cañizares R., Benítez, E., & Ogunseitan, O. A. (2011). Molecular analyses of β -glucosidase diversity and function in soil. *European Journal of Soil Biology*, 47, 1-8.
- Cleveland, C. C., Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., & Townsend, A. R. (2007). Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. *Biogeochemistry*, 82, 229-240.
- Devevre, O., Garbaye, J., & Botton, B. (1996). Release of complexing organic acids by rhizosphere fungi as a factor in Norway spruce yellowing in acidic soils. *Mycology Research*, 100,1367-1374.
- Devevre, O. C., & Horwath, W. R. (2000). Decomposition of rice straw and microbial carbon use efficiency under different soil temperatures and moistures. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1773-1785.
- Eilers, K. G., Lauber, C. L., Knight, R., & Fierer, N. (2010). Shift in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 896-903.
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 601-606.

- FAO. (2002). *Captura de carbono en los suelos para un mejor manejo de la tierra*. Basado en el trabajo de Michel Robert. París, Francia: Institut National de Recherche Agronomique.
- Glazer, N., & Alexander, N. H. (1998). *Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Gon, H. A. C., & Neue, H. U. (1996). Oxidation of methane in the rhizosphere of rice plants. *Biology and Fertility of Soils*, 22, 359-366.
- Howard, R. L., Abotsi, E., & van Rensburg, J. E. (2003). Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619.
- Jellison, J. et al. (1997). The Role of Cations in the Biodegradation of Wood by the Brown Rot Fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39, 165-179.
- Johnson, S. E., Angeles, O. R., Brar, D. S., & Buresh, R. J. (2006). Faster anaerobic decomposition of a brittle straw rice mutant: Implications for residue management. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1880-1892.
- Jorquera, M. A., Hernández, M., Martínez, O., Marschner, P., & Mora, M. L. (2010). Detection of aluminium tolerance plasmids and microbial diversity in the rhizosphere of plants grown in acidic volcanic soil. *European Journal of Soil Biology*, 46, 255-263.
- Kandeler, E., Tschirko, D., Stemmer, M., Schwarz, S., & Gerzabek, M. (2001). Organic matter soil microorganism-investigations from the micro-to the macro scale. *Die Bodenkultur*, 52(1), 117-131.
- Kiiskinen, L., Ratto, M., & Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 640-646.
- Kimura, M., Murase, J., & Lu, Y. (2004). Carbon cycling in rice field ecosystems in the context of input, decomposition and translocation of organic materials and the fates of their end products (CO₂ and CH₄). *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1399-1416.
- Knight, T. R., & Dick, R. P. (2004). Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 2089-2096.
- Lamirato, C., Miltner, A., Wick, L. Y., & Kästner, M. (2010). Hydrolysis of cellobiose by β -glucosidase in the presence of soil minerals e Interactions at solid liquid interfaces and effects on enzyme activity levels. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 2203-2210.
- Lasheras, M. S. (2004). Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.

- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 625-645.
- Lu, Y., Watanabe, A., & Kimura, M. (2003). Carbon dynamics of rhizodeposits, root- and shoot-residues in a rice soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1223-1230.
- Morales, R., Bernal, G., López, M., y Calvache, M. (2004). *Estudio de la diversidad microbiana en sistemas agroforestales de café (Coffea arabica), y cultivos de pastos y arroz (Oriza sativa) en dos tipos de suelo del sur de Manabí*. Quito: Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera del Ecuador (Ancupa); Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Ortiz-Moreno, M., & Uribe-Vélez, V. (2010). Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabana de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical. *Revista Argentina de Ciencias del Suelo*, 28(2), 169-180.
- Ovando-Chacón, S., y Waliszewski, K. (2005). *Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos*. Recuperado de: www.ujat.mx/publicaciones/uciencia Fecha de consulta: 21: 111-120.
- Páez, A., Castro, D., Martínez, M., y Pedroza, A. (2001). Producción y evaluación en campo de un inoculante termofílico acelerador del compostaje. *Asocoflores*, 60, 34-40.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185-194.
- Sass, R. L., Fisher, F. M., & Harcombe, P. A. (1991). Mitigation of methane emissions from rice fields: Possible adverse effects of incorporated rice straw. *Global Biogeochemical Cycles*, 5, 275-287.
- Scow, K. M. (1997). Soil Microbial Communities and Carbon Flow in Agroecosystems. L. E. Jackson (Ed.). *Ecology in Agriculture* (pp. 367-413). San Diego, California, USA: Academic Press.
- Swamy, J., & Ramsay, V. (1999). Effects of Mn²⁺ and NH₄⁺ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51, 391-396.
- Tabatabai, M., & Bremner, A. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 301-307.
- Thorn, R., Adinarayana, R., Harris, D., & Paul, A. (1996). Isolation of Saprophytic Basidiomycetes from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4288-4292.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. & Gil-Sotres, F. (2000). Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galacia, NW Spain): specific parameters. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 747-755.

- Tuomela, M. (2002). *Degradation of lignin and other ^{14}C -labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fung*. Helsinki: Academic dissertation in microbiology. University of Helsinki.
- Turner, B. L., Hopkins, D. W., Haygarth, P. M., & Ostle, N. (2002). B-Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20, 157-162.
- Ullah, M., Bedford, C., & Evans, C. (2000). Reactions of pentacholophenol with laccase from *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of clorophenols in aqueous effluents. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 832-837.
- Wagner, G. H., & Wolf, D. C. (1999). Carbon transformations and soil organic matter formation. In D. M. Sylvia, Fuhrmann J. J., Hartel P. G., & D. A. Zuberer (Eds.). *Principles and applications of soil microbiology*. New Jersey: Prentice Hall, Inc.
- Wang, X-C., & Lu, Q. (2006). Beta-Glucosidase Activity in Paddy Soils of the Taihu Lake Region, China. *Pedosphere*, 16, 118-124.
- Yagi, K., Minami, K., Ogawa, Y. (1990). Effects of water percolation on methane emission from some Japanese paddy fields. *Soil Science and Plant Nutrition*, 36, 599-610.
- Yan, J., Pan, G., Li, L., Quan, G., Ding, C., & Luo, A. (2010). Adsorption, immobilization, and activity of β -glucosidase on different soil colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 348, 565-570.
- Yang, S., Fan, H., Yang, C., & Lin, I. (2003). Microbial population of spruce soil in Tatachia mountain of Taiwan. *Chemosphere*, 52, 1489-1498.
- Zech, W. *et al.* (1997). Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79, 117-161.

Determinación de la diversidad de microorganismos rizosféricos no cultivables asociados a suelos arroceros de los departamentos de Tolima y Meta

Giovanna Landazábal¹, Daniel Uribe-Vélez^{1,*}

¹ Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.

* duribev@unal.edu.co

En las últimas décadas, un número considerable de trabajos han mostrado que la estructura y diversidad de las comunidades microbianas son afectadas por variables ambientales, fisicoquímicas, ecológicas y prácticas agrícolas asociadas al uso y manejo del suelo (Buchley y Schmidt, 2003; Garbeva *et al.*, 2004). Estos resultados han incrementado el interés por conocer y describir las comunidades microbianas de un vasto número de agro-ecosistemas, con manejos agrícolas y condiciones diversas, con el objeto de acumular información que permita identificar parámetros de las comunidades microbianas que pueden ser empleados como indicadores de calidad del suelo (Nielsen y Winding, 2002; Winding *et al.*, 2005). Igualmente, se ha buscado establecer cómo los cambios observados en estas comunidades, producto de la implementación de prácticas agronómicas específicas, impacta positiva o negativamente la productividad y sostenibilidad de los agro-ecosistemas (Shannon *et al.*, 2002; Nannipieri *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007).

La información en esta área ha aumentado de forma significativa en los últimos quince años, gracias a la implementación de nuevas técnicas moleculares en ecología microbiana (Uribe-Vélez y Flórez-Zapata, 2011). Estudios anteriores se basaron, fundamentalmente, en técnicas dependientes de cultivo, las cuales resultan inadecuadas para describir las comunidades microbianas de muestras ambientales en términos de diversidad, estructura y dinámica. La limitación de este tipo de estudios consiste fundamentalmente en que la fracción cultivada no es representativa de la abundancia y riqueza, debido, entre otras condiciones, a las dificultades para reproducir en el laboratorio los requerimientos ambientales y nutricionales de los microorganismos. En este contexto, diversos autores estiman que el número de microorganismos cultivables no supera el 1 % del total de la población del suelo (Garbeva, 2004; Nannipieri *et al.*, 2003; Nocker *et al.*, 2007).

Por el contrario, las técnicas moleculares han hecho posible el reconocimiento y la medición de la enorme diversidad genotípica microbiana del suelo, gracias a la selección y al uso de moléculas marcadoras como cronómetros moleculares, que permiten establecer las relaciones filogenéticas entre microorganismos (DeLong y Pace, 2001; Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). Por otra parte, el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y programas de análisis hacen posible la obtención y comparación de un gran número de secuencias (Tringe *et al.*, 2005). La conjunción de estas técnicas ha facilitado el desarrollo de conceptos como el de *huella genética*, que suministra información sobre comunidades microbianas (archaeas, bacterias, hongos) a partir de patrones o perfiles de diversidad genética, representados en la variación de la secuencia de un cronómetro molecular o marcador filogenético específico. Estos marcadores son amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de DNA extraído directamente de muestras ambientales como el suelo, sin recurrir al cultivo de microorganismos. A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes técnicas de huella genética que permiten la comparación espacial y temporal de comunidades bajo diferentes ambientes o tratamientos (Kirk *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006). Los patrones de diversidad genética se pueden obtener al resolver los fragmentos de DNA mediante técnicas de electroforesis, siendo las diferencias de los perfiles electroforéticos representadas en el número, posición e intensidad de bandas de DNA, un reflejo de las diferencias en la riqueza y abundancia de poblaciones de comunidades microbianas específicas (Shannon *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2004). Más recientemente se han desarrollado técnicas de secuenciación masiva (e.g. pirosecuenciación), que facilitan la obtención de una gran cantidad de secuencias asociadas a un marcador particular, posibilitando la estimación de la estructura de la comunidad a través del análisis de las secuencias mediante aproximaciones bioinformáticas (Green y Rubin, 2005). Sin embargo, esta aproximación acarrea mayores costos en su ejecución, y limita su alcance en estudios en los que se pretende analizar un número considerable de muestras.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente denaturante

Entre las técnicas de huella genética existentes, la electroforesis en gel en gradiente denaturante de un marcador molecular amplificado mediante PCR (PCR-DGGE, por sus siglas en inglés), es una de las más utilizadas. Esta técnica, inicialmente usada en los años 1980 por la comunidad científica médica para identificar genes mutantes (Borresen *et al.*, 1988; Hovig *et al.*, 1991), fue adaptada en 1993 por Muyzer y colaboradores para el análisis de comunidades en ecosistemas naturales con una baja diversidad. Posteriormente, varios grupos aplicaron el método para el análisis de

comunidades microbianas complejas provenientes de diferentes ambientes como el suelo (Duineveld *et al.*, 2001; Heuer *et al.*, 1997; Nakatsu *et al.*, 2000).

El DGGE/TGGE consiste en la separación electroforética de fragmentos de DNA de igual tamaño pero diferente secuencia, de acuerdo con su composición de bases. Esta separación ocurre debido a la denaturación parcial que sufren los fragmentos de DNA cuando migran en geles de poliacrilamida que presentan un gradiente lineal de agentes químicos denaturantes del DNA (DGGE), o un gradiente lineal de temperatura (TGGE) (Muyzer, 1999). La denaturación de los fragmentos de DNA ocurre en dominios discretos (fragmentos de pares de bases) con una temperatura de denaturación (o sensibilidad a un agente químico) idéntica, produciendo fragmentos ramificados que reducen su movilidad en el gel. En este tipo de análisis se espera que cada banda corresponda a una secuencia de DNA que representa un ribotipo único en la comunidad o unidad taxonómica operativa (OTU, por sus siglas en inglés), y que la intensidad de las bandas sea un reflejo de la abundancia en la comunidad de cada ribotipo u OTU (Shannon *et al.*, 2002). La migración diferencial ocurre porque se necesita más concentración del compuesto denaturante (o temperaturas más altas), para separar las secuencias con más alto contenido de GC (Guanina-Citocina), debido a las diferencias en el número de puentes de hidrógeno entre pares de bases (tres puentes entre GC y dos entre AT (Adenina-Timina)) (Muyzer, 1999; Muyzer *et al.*, 1993).

Inicialmente, el DGGE/TGGE fue diseñado para el análisis de comunidades microbianas, utilizando el gen rDNA 16S o 18S, consolidado como cronómetro molecular gracias a características como su distribución universal, la presencia de dominios con tasas independientes y moderadas de cambio de secuencia, mínima transferencia horizontal y alto grado de conservación estructural y funcional (Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). Estas características lo convirtieron en un marcador ampliamente usado para asignar de manera sistemática la mayor parte de las especies microbianas identificadas a la fecha. Sin embargo, cualquier gen puede ser amplificado por PCR y resuelto en un gel DGGE/TGGE, lo que permite el análisis no solamente de las comunidades de bacterias, hongos o archeas totales, sino también de grupos funcionales, de acuerdo con la selección y amplificación de genes específicos mediante el diseño de *primers* para estos genes (Kirk *et al.*, 2004). De manera adicional, aunque la huella genética no puede revelar la composición taxonómica de una comunidad, es posible obtener información filogenética de los miembros más representativos por elución y posterior reamplificación y secuenciación de bandas de interés (Kirk *et al.*, 2004). Recientemente, los estudios de las comunidades microbianas han sido polifásicos empleando métodos basados en técnicas dependientes e independientes de cultivo, con el objeto de producir mayor información de las comunidades, ya que los

grupos identificados por cada método son generalmente diferentes (Nannipieri *et al.*, 2003; Uribe-Vélez y Flórez-Zapata, 2011).

El DGGE es una técnica muy importante para el estudio de las comunidades microbianas no cultivables, por la posibilidad que ofrece de comparar, de una forma rápida y económica, muestras ambientales de diferente origen que se encuentran bajo diversas condiciones o tratamientos. De allí la gran aceptación de la comunidad científica para el desarrollo de estudios de análisis de comunidades microbianas en suelo, que se hace evidente por el número creciente de estudios realizados con este propósito desde 1997 (Garveba *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Torsvik *et al.*, 1998; Torsvik y Ovreas, 2002). Igualmente, cabe mencionar que algunas técnicas recientes como los microarreglos o la nueva generación de técnicas de secuenciación de alto rendimiento, como la pirosecuenciación, permiten obtener mayor cantidad de información en términos de la composición taxonómica o diversidad funcional de las comunidades en comparación con el DGGE; sin embargo, dichas técnicas requieren diseños más elaborados y son más costosas en su ejecución (Nakatsu *et al.*, 2000; Nocker *et al.*, 2007; Uribe-Vélez y Flórez-Zapata, 2011).

Para el agro-ecosistema de arroz, el DGGE ha sido utilizado para determinar el efecto del tipo de fertilización, mostrando que la fertilización orgánica e inorgánica sostenida durante más de 20 años tiene efecto sobre la diversidad bacteriana, siendo la fertilización orgánica la que promueve mayor diversidad genética e incluso aumenta la biomasa microbiana (Gu *et al.*, 2009). Por otra parte, Lopes *et al.* (2011) evaluaron el efecto del manejo tradicional y orgánico sobre la comunidad bacteriana edáfica en parcelas experimentales de cultivo de arroz inundado, mostrando que hay diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana asociadas al tipo de manejo. Otros autores han empleado el uso del DGGE para evaluar la aplicación de herbicidas y pesticidas sobre las comunidades microbianas asociadas al cultivo (Chen *et al.*, 2009; Das y Debnath, 2006). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se ha realizado bajo condiciones de invernadero, microcosmos o parcelas experimentales y no en cultivos comerciales, con las limitaciones que estos ambientes presentan para sacar conclusiones reales en comparación con las condiciones que se desarrollan en agro-ecosistemas comerciales. Así mismo, cabe señalar que muy pocos trabajos han evaluado aspectos relacionados con la comunidad microbiana no cultivable asociada a la rizósfera de cultivos de arroz sembrados en ambientes secanos.

Determinación de la estructura de las comunidades microbianas en cultivos de arroz

Atendiendo a la falta de información asociada a la identificación de microorganismos no cultivables en suelos arroceros del país, el presente trabajo

tuvo como objetivos: 1) comparar mediante PCR-DGGE la estructura y diversidad de las comunidades de bacterias y hongos rizosféricos de 16 fincas arroceras localizadas en cuatro regiones de los departamentos de Tolima y Meta, para dos períodos de muestreo (capítulo 2 para la descripción de las fincas), y 2) establecer los factores físicos y químicos o de manejo que afectan la estructura y diversidad de las comunidades de bacterias y hongos rizosféricos de cultivos de arroz comercial.

Para cumplir estos objetivos metodológicamente, se desarrolló una primera etapa que consistió en la extracción del DNA de 0,25 g de suelo rizosférico con el kit de extracción Ultra-Clean™ de MoBio (según instrucciones de la casa comercial) y la amplificación, a partir del DNA extraído, de la región variable V3 del gen rDNA 16S de bacterias y de la región del espaciador transcrito interno ITS1-ITS2 de hongos. La región V3 se amplificó mediante PCR, utilizando los iniciadores universales 338F con cola GC (40 pb) y 507R (Muyzer *et al.*, 1993). En hongos, la región ITS1-ITS2 se amplificó con una PCR inicial utilizando los iniciadores EF4 e ITS4 y una PCR anidada con los primers ITS1F con cola GC (40 pb) e ITS4 (Anderson *et al.*, 2003).

Con las secuencias de DNA amplificadas, se elaboraron geles de DGGE de acrilamida/bisacrilamida al 8 %, con gradiente denaturante (úrea y formamida) entre 45 y 60 % para el dominio bacteria, y geles al 6 % con gradiente denaturante (25 y 45 %) para hongos. La electroforesis se realizó utilizando el sistema universal de detección de mutaciones Dcode (BioRad Laboratorios USA), ajustando para la corrida electroforética un voltaje constante de 80V durante 16 horas a 60 °C. Luego, los geles fueron teñidos con Syber Gold 1X durante una hora y la imagen fue capturada en un analizador de imágenes (BioRad Laboratorios, USA). Con las imágenes y utilizando el software de análisis Quantity One, versión 4 (BioRad Laboratorios, USA), se diseñaron matrices binarias de presencia-ausencia que permitieron hacer análisis de *clusters* y matrices de distancia, mediante una estandarización del patrón de bandas, asignando a cada banda una posición y una intensidad relativa. A partir de estas matrices se calculó la riqueza, asumiendo cada banda marcada como un OTU, y la abundancia de acuerdo con la intensidad en píxeles de cada OTU. Con estos valores se calcularon los índices de dominancia de Simpson 1/D, diversidad de Shannon-Weiner y equitatividad de Pielou (Magurran, 1989).

Determinación de la estructura de las comunidades bacterianas

Se realizaron geles de DGGE con los siguientes arreglos: del dominio bacteria, fincas de Tolima y Meta del primero y segundo año de muestreo por separado; fincas de Tolima del primero y segundo año; fincas de Meta del primero y segundo año, y fincas de Tolima y Meta por separado, con sus respectivas réplicas de suelo. Para hongos se hicieron los mismos arreglos. De esta

manera, en cada gel se compararon 16 muestras que permitieron establecer diferencias en la estructura de las comunidades microbianas entre réplicas por finca, entre fincas, regiones, sistema de siembra y período de muestreo.

Inicialmente se verificó la reproducibilidad del proceso de extracción y PCR para una misma muestra. Los perfiles genéticos de los duplicados del proceso que fueron resueltos en un mismo gel tuvieron una similitud del 100 %, lo que permitió confirmar la reproducibilidad y confiabilidad de la técnica. La figura 6.1A muestra de manera cualitativa los perfiles de las réplicas de muestras de suelo por finca, recolectadas bajo las mismas condiciones. Como se puede observar, las réplicas de los perfiles genéticos de DNA de las fincas de Meta del primer año son más parecidas entre sí que los perfiles genéticos entre las diferentes fincas.

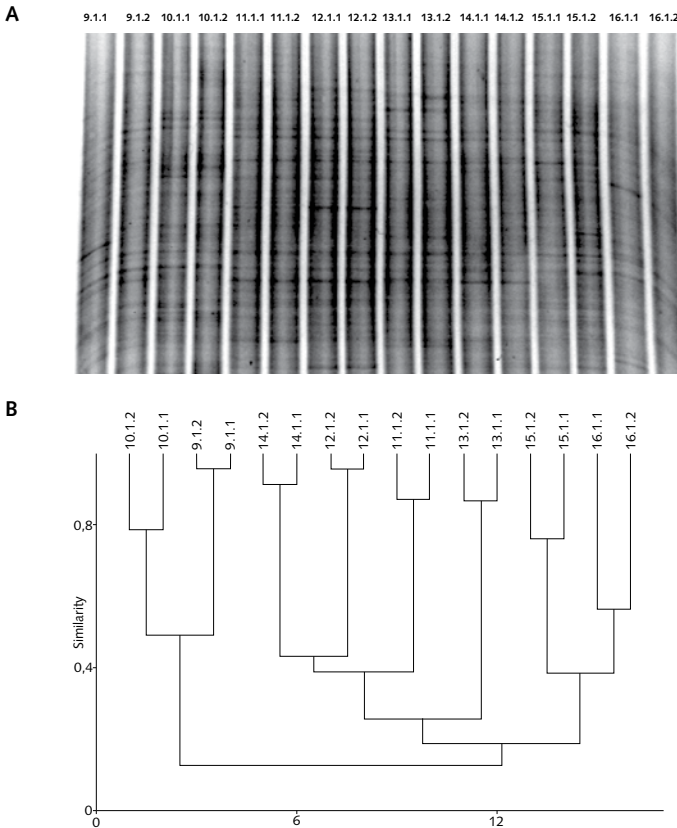


Figura 6.1 A. Gel de electroforesis en gradiente denaturante del patrón de bandas asociado al gen rDNA 16S, de fincas arroceras de Meta, primer año de muestreo, réplicas 1 y 2. B. Análisis de *clusters* del DGGE del análisis de la figura 6.1 A. El primer número representa el número de la finca, el segundo el año de muestreo y el tercero el número de réplica. Las fincas 9, 10, 15 y 16 corresponden a cultivos secanos, y las fincas 11-14, a cultivos inundados.

Fuente: autores

El análisis de *clusters* (figura 6.1b) agrupó en primer lugar las réplicas de muestra de suelo por finca con índices de similaridad entre 0,96-0,60, y en segundo lugar agrupó las fincas cuyos perfiles son más parecidos entre sí, con índices de similaridad entre 0,50-0,29. Este mismo resultado se repitió para las réplicas de las fincas de Meta, segundo año y Tolima primero y segundo año, lo que permite corroborar un nivel de reproducibilidad confiable con respecto a la muestra (datos no mostrados).

Los perfiles del DGGE para el gen rDNA 16S de todas las fincas arroceras evaluadas (Tolima y Meta) del primero y segundo año se muestran en las figuras 6.2A y 6.2B, respectivamente. El análisis permitió asignar 38 bandas para el año 1 y 39 bandas para el año 2, en un gradiente de denaturación entre 45 a 60 %. El análisis de *clusters* del DGGE rDNA 16S de las fincas de Tolima y Meta para el primero y segundo año agrupa las fincas en dos *clusters* diferenciando claramente el departamento de origen de las muestras (figuras 6.2 y 6.3). En este sentido, para el primer año, las fincas de Meta están en un *cluster* y las fincas del Tolima en otro, a excepción de la finca 14 (de Meta) que se agrupa con las fincas de Tolima. En el análisis de *clusters* del DGGE del segundo año se separaron nuevamente las fincas de Tolima de las de Meta, y adicionalmente las fincas de Tolima se discriminaron en Tolima norte y Tolima sur, con excepción de la finca 8, que se agrupa con las fincas de Tolima norte. En el caso de Meta, se discriminaron las fincas por sistema de siembra con excepción de la finca 13 (figura 6.3). Merece igualmente mencionar la asociación evidenciada de acuerdo con el sistema de siembra (secano e inundado) para las fincas de Meta, pues las fincas secanas (9, 10, 15 y 16) están agrupadas en un *cluster* en ambos años, y las fincas inundadas en otro, con excepción de la finca 13 en el año 2 y de la finca 14 en el año 1 (figuras 6.3A y 6.3B). Estos resultados permiten evidenciar una clara diferenciación de la estructura de las comunidades de bacterias de las fincas arroceras asociada con cada región, producto posiblemente de las diferencias en términos de las características físico-químicas del suelo y el sistema de siembra. En este sentido se destaca la finca 14 cuyo perfil de bandas presenta mayor similitud con las fincas 7 y 8 de Tolima sur, sugiriendo que en este caso el sistema de cultivo ejerce un efecto importante en la definición de la estructura de la comunidad microbiana (figuras 6.3A y 6.3B).

Por otra parte, el análisis de *cluster* del DGGE de bacterias de todas las fincas (Tolima y Meta) del segundo año, se corresponde con el patrón de agrupación de las fincas del análisis PCA de los factores físicoquímicos para el mismo año (capítulo 2), lo que indica una correlación entre las propiedades físicoquímicas del suelo y la estructura de las comunidades de bacterias asociadas a la rizósfera en cultivos de arroz. Esto sugiere que la estructura de esta comunidad está en gran medida modelada por los factores físicoquí-

micos, y estos, a su vez, están determinados de una forma importante por la región y el sistema de siembra.

Determinación de la estructura de las comunidades de hongos

Los resultados del DGGE de la región ITS1 e ITS2 del DNA total del suelo rizosférico de todas las fincas arroceras evaluadas (Tolima y Meta) del primero y segundo año se muestran en las figuras 6.4a y 6.4b, respectivamente. El análisis permitió asignar 32 y 35 bandas para el año 1 y 2, respectivamente, en un gradiente de denaturación entre 20 a 45 %.

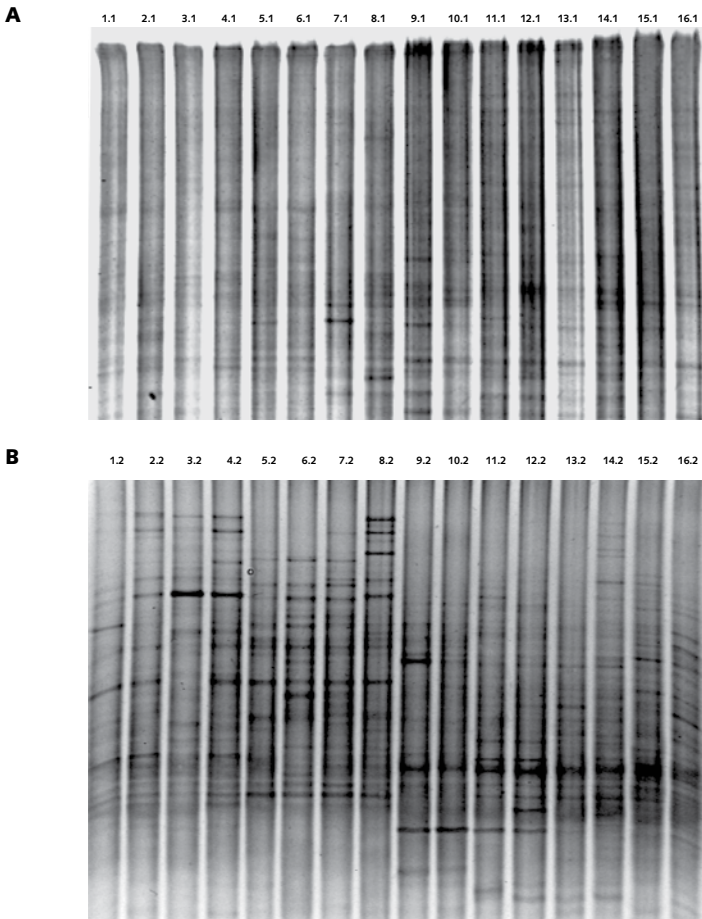


Figura 6.2 Gel de electroforesis en gradiente denaturante del patrón de bandas asociado al gen rDNA 16S de fincas arroceras de Tolima y Meta. A. Primer año. B. Segundo año. El primer número representa la finca y el segundo el año de muestreo. Las fincas 1-4 corresponden a la región de Tolima norte; 5-8, Tolima sur; 9, 10, 15 y 16, cultivos secanos en Meta, y 11-14, cultivos inundados en Meta.

Fuente: autores

El análisis de *clusters* en hongos no reveló un patrón de agrupación definido como en bacterias (figuras 6.5a y 6.5b). En ninguno de los dos años se observó una separación completa de las fincas de Meta y de Tolima, ya que para el primer año la finca 13 se agrupó con las fincas 4 y 5, mientras que para el segundo, las fincas 7 y 8 de Tolima se agruparon con las fincas 13-16 pertenecientes a la región de Meta. Tampoco se evidenció un patrón claro relacionado con el sistema de siembra. Trabajos previos sugieren que las comunidades de hongos son más sensibles a cambios asociados a las prácticas agrícolas, disminuyendo así el efecto relacionado con el tipo de suelo (Johnson *et al.*, 2003).

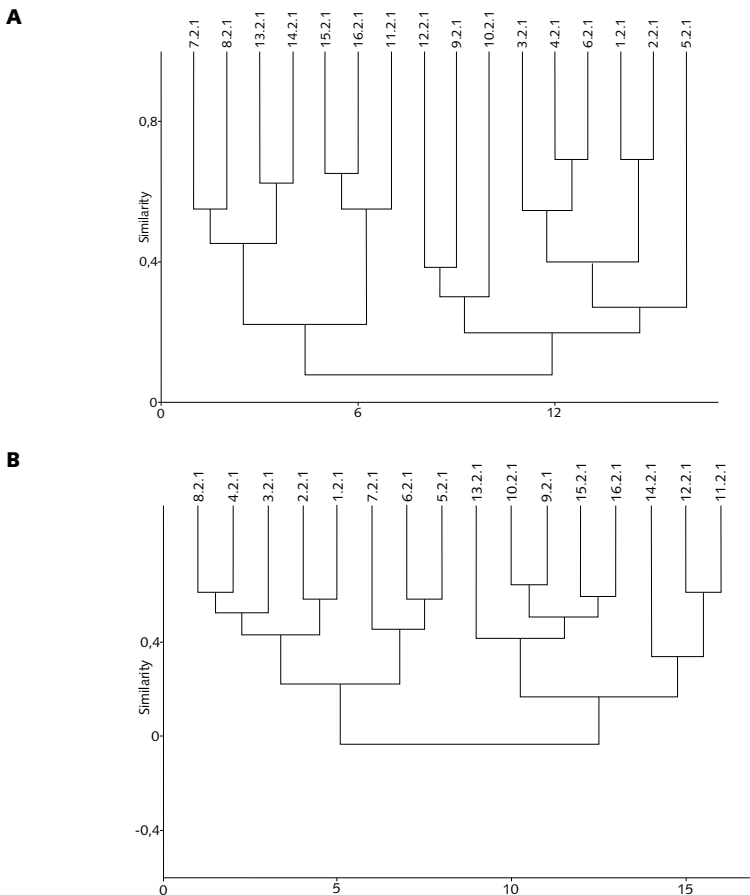


Figura 6.3 Análisis de *cluster* DGGE rDNA de 16S fincas arroceras de Tolima y Meta. A. Primer año. B. Segundo año. El primer número representa la finca y el segundo el año de muestreo. Las fincas 1-4 corresponden a la región de Tolima norte; 5-8, Tolima sur; 9, 10, 15 y 16, cultivos secanos en Meta, y 11-14, cultivos inundados en Meta.

Fuente: autores

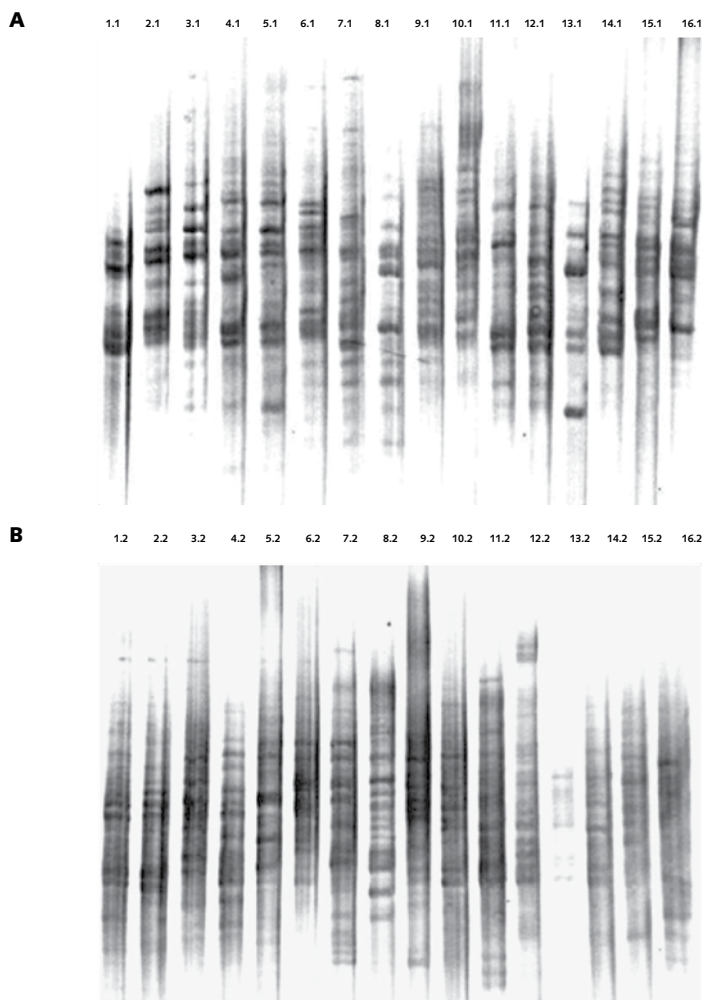


Figura 6.4 Gel de electroforesis en gradiente denaturante del patrón de bandas asociado a la región ITS1 e ITS2 de fincas arroceras de Tolima y Meta. A. Primer año. B. Segundo año. El primer número representa la finca y el segundo el año de muestreo. Las fincas 1-4 corresponden a la región del Tolima norte; 5-8, Tolima sur; 9, 10, 15 y 16, cultivos secanos en Meta, y 11-14, cultivos inundados en Meta.

Fuente: autores

Índices de diversidad de bacterias y hongos

Los índices de diversidad de la comunidad de bacterias y hongos no mostraron diferencias significativas asociadas a la región o el sistema de siembra en los dos años (tablas 6.1-6.2). Estos resultados indican que si bien hay diferencias entre regiones, en términos de la estructura de la comunidad microbiana, determinada esta por los perfiles asociados a cada finca, dichas

Determinación de la diversidad de microorganismos rizosféricos no cultivables asociados a suelos arroceros de los departamentos de Tolima y Meta

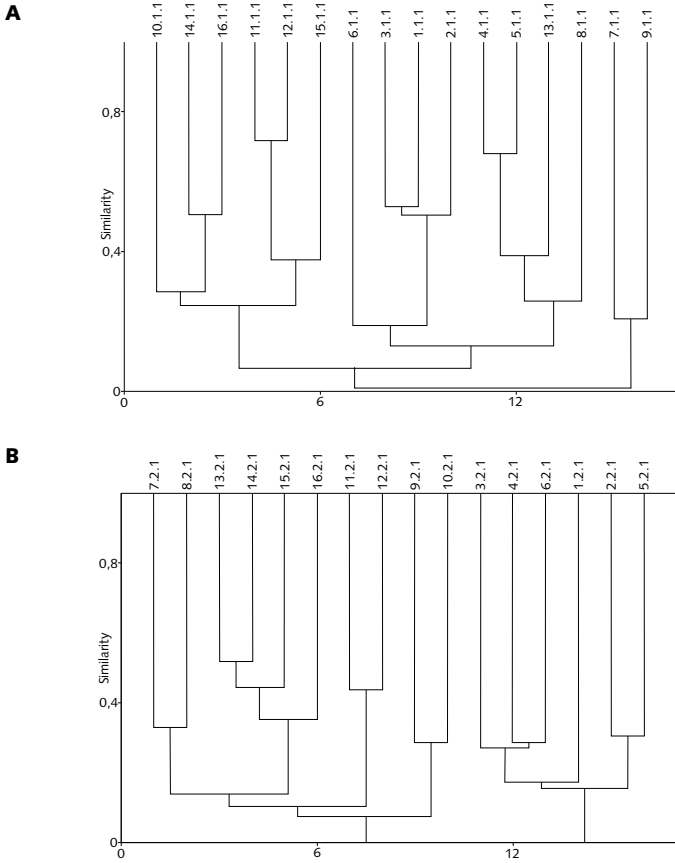


Figura 6.5 Análisis de *cluster* de DGGE, región ITS1 e ITS2, fincas arroceras de Tolima y Meta. A. Primer año. B. Segundo año. El primer número representa la finca y el segundo el año de muestreo. Las fincas 1-4 corresponden a la región de Tolima norte; 5-8, Tolima sur; 9, 10, 15 y 16, cultivos secanos en Meta, y 11-14, cultivos inundados en Meta.
Fuente: autores

diferencias no están definidas por el número de OTU, sino por el patrón de estos en cada perfil. Adicionalmente, no se encontraron correlaciones entre estos índices y otras variables analizadas. Trabajos anteriores han discutido la falta de coherencia y confiabilidad de los índices de diversidad, señalando que es el análisis de la estructura de la comunidad, más que la diversidad representada en índices, la que ofrece información concluyente sobre las comunidades microbianas (Hartmann y Widmer, 2006).

Los estudios de las comunidades microbianas en cultivos de arroz se han diversificado enfocándose en evaluar aspectos puntuales como la diversidad y la estructura de las comunidades asociadas al suelo (rizosférico y no rizosférico) y residuos vegetales como el tamo (Asakawa y Kimura, 2008). Así

mismo, se ha estudiado la diversidad de grupos funcionales de interés, tales como diazótrofos (Wartiainen *et al.*, 2008), oxidadores de amonio (Nicolaisen *et al.*, 2004) y oxidadores de metano y metanógenos (Bodelier *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2006). La mayoría de estos resultados han sido enfocados a representantes del dominio bacteria y en algunos casos a archaeas y hongos. Algunos de estos trabajos han evaluado el efecto de diferentes prácticas agrícolas como la aplicación de fertilizantes químicos (Gu *et al.*, 2009; Wenhui *et al.*, 2007), biofertilizantes (Muthukumarasamy *et al.*, 2007), herbicidas y pesticidas (Chen *et al.*, 2009; Das y Debnath, 2006) y los cambios en la estructura y diversidad de las comunidades inducida por los cambios a través del ciclo del cultivo (Del Castillo, 2010), mostrando que son múltiples los factores ecológicos, ambientales y de manejo agrícola que ejercen un efecto sobre las comunidades microbianas en cultivos de arroz.

Entre los factores ecológicos, Del Castillo (2010) puso de manifiesto el efecto de las plantas y su estado fenológico sobre la comunidad de bacterias rizosféricas de cultivos de arroz comercial. Dicha autora propone que la rizodeposición de fotosintatos es variable a lo largo del ciclo del cultivo, lo cual modula los cambios en las poblaciones de bacterias rizosféricas durante el ciclo. Sin embargo, para un mismo estado fenológico, hay un porcentaje significativo de bandas diferentes asociado a cada una de las parcelas evaluadas, lo que sugiere que las condiciones ambientales o de manejo agronómico también ejercen un efecto sobre dichas comunidades. Por otra parte, Murase *et al.* (2006), mediante un ensayo en microcosmos en el que simulaban la condición de inundación, y valiéndose de las técnicas de huella genética DGGE y RFLP, demostraron que “el pastoreo” de protistas afecta de manera significativa la diversidad y la estructura de la comunidad bacteriana, y que este efecto es mayor en la capa superficial óxica en comparación con la capa anóxica, mostrando la importancia de la disponibilidad del oxígeno en estas interrelaciones.

En cuanto a las prácticas agronómicas, se reconoce el efecto del sistema de siembra, pues es ampliamente conocido que los cultivos inundados tienen una microflora en la que predominan grupos anaerobios o anaerobios facultativos, mientras que en los cultivos secos prevalecen poblaciones de bacterias y hongos esencialmente aerobias (Liesack *et al.*, 2000). Doi *et al.* (2007), utilizando el DGGE y el FISH compararon la diversidad total de bacterias asociadas a la rizósfera de dos cultivos de arroz, uno seco y otro inundado, encontrando una diversidad para bacterias más grande en el cultivo seco con respecto al inundado e identificando a *Klebsiella planticola* y *Bacillus fusiformis* como bacterias predominantes en la condición seca y a *Clostridium bifermentans* y una bacteria no cultivable para la condición inundada. Por otra parte, el FISH reveló una predominancia de bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC en ambos tipos de cultivo. En el contexto de nuestros resultados, el sistema de siembra ejerce un efecto

Determinación de la diversidad de microorganismos rizosféricos no cultivables
asociados a suelos arroceros de los departamentos de Tolima y Meta

Tabla 6.1 Índices de riqueza y diversidad de la comunidad de bacterias de las fincas de Tolima y Meta, primer y segundo año.

Finca	Riqueza (núm. de OTU)		Diversidad (Shannon)		Dominancia (Simpson_1/D)		Equitatividad (Pielou)	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
1	9	12	2,19	2,47	0,84	0,91	0,99	0,99
2	10	15	2,31	2,69	0,87	0,93	1,00	0,99
3	8	16	2,08	2,58	0,85	0,90	1,00	0,93
4	12	17	2,44	2,72	0,89	0,92	0,98	0,96
5	10	13	2,28	2,52	0,88	0,92	0,99	0,98
6	10	17	2,16	2,81	0,83	0,94	0,94	0,99
7	17	19	2,71	2,92	0,91	0,94	0,96	0,99
8	16	17	2,73	2,71	0,92	0,92	0,98	0,96
9	15	10	2,71	2,19	0,92	0,87	1,00	0,95
10	12	13	2,46	2,52	0,90	0,91	0,99	0,98
11	9	10	2,16	2,19	0,86	0,87	0,98	0,95
12	11	11	2,32	2,25	0,88	0,88	0,97	0,94
13	9	9	2,19	2,15	0,87	0,88	0,99	0,98
14	10	21	2,24	2,97	0,88	0,94	0,97	0,98
15	8	20	2,09	2,90	0,85	0,94	1,00	0,97
16	10	15	2,30	2,68	0,88	0,93	0,99	0,99

Fuente: autores

Tabla 6.2 Índices de riqueza y diversidad de la comunidad de hongos de las fincas de Tolima y Meta primer y segundo año.

Finca	Riqueza (núm. de OTU)		Diversidad (Shannon)		Dominancia (Simpson_1/D)		Equitatividad (Pielou)	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
1	7	11	1,88	2,38	0,84	0,90	0,97	0,99
2	10	15	2,17	2,70	0,87	0,93	0,94	1,00
3	14	9	2,51	2,18	0,91	0,89	0,95	0,99
4	16	10	2,71	2,29	0,93	0,90	0,98	0,99
5	13	18	2,52	2,88	0,92	0,94	0,98	0,99
6	12	15	2,45	2,68	0,91	0,93	0,98	0,98
7	11	15	2,37	2,68	0,90	0,93	0,99	0,99
8	13	12	2,52	2,44	0,92	0,91	0,98	0,98
9	11	15	2,39	2,70	0,91	0,93	1,00	0,99
10	14	18	2,63	2,86	0,93	0,94	1,00	0,99
11	9	11	2,16	2,38	0,88	0,90	0,98	0,99
12	12	10	2,46	2,27	0,91	0,89	0,99	0,98
13	6	14	1,73	2,61	0,81	0,92	0,96	0,99
14	12	13	2,46	2,53	0,91	0,92	0,99	0,98
15	10	13	2,28	2,54	0,90	0,92	0,99	0,99
16	11	13	2,35	2,54	0,90	0,92	0,98	0,99

Fuente: autores

considerable en las características físico-químicas del suelo (capítulo 2); sin embargo, en el marco de las dos grandes regiones analizadas, pareciera que ejerce un factor secundario como modelador de las comunidades bacterianas. Si la condición inundada o seca fuera el factor principal, el patrón de asociación, siguiendo este principio, habría agrupado a todas las fincas inundadas sin importar la región, pero ese no fue el caso. Aun cuando las fincas 11 a 14 de Meta están sembradas bajo el sistema de siembra inundado como las de Tolima, estas fueron más similares a las fincas secas de Meta. Sin embargo, en el caso de Meta, claramente la estructura de la población bacteriana permitió el agrupamiento de los perfiles generados de acuerdo con el tipo de cultivo (secano e inundado) a pesar de que dichos cultivos se encontraban en suelos de origen similar, con la única excepción de la finca 14 en el año 1, que incluso se agrupó con las fincas 7 y 8 de Tolima y la finca 13 en el año 2 (figura 6.3), lo cual indica que el tipo de cultivo sí ejerce un efecto importante como modulador de la estructura de la población bacteriana, aunque dicho efecto es menor en comparación con el origen del suelo.

Con respecto al sistema de riego, Del Castillo (2010) encontró que el agua es un elemento determinante de la diversidad y estructura de las comunidades de bacterias rizosféricas en cultivos de arroz, al evaluar los cambios en la diversidad y estructura de las comunidades con la entrada masiva de agua en parcelas que se habían mantenido secas después de la recolección del grano. También mostró que tipos de riego con aportes de materia orgánica diferentes, tienen efecto sobre las comunidades bacterianas.

Este trabajo tuvo como objetivo hacer un diagnóstico inicial general y global de las comunidades de bacterias y hongos rizosféricos asociado a 16 fincas o unidades productoras de arroz pertenecientes a cuatro regiones tradicionalmente arroceras de importancia para el país. Teniendo en cuenta la aproximación, cabe resaltar que si bien las unidades productoras evaluadas presentaban condiciones variables con relación al sistema de riego, el grado de tecnificación, los planes de fertilización y control de malezas y enfermedades, fue la condición física y química del suelo la que resultó determinante para explicar la estructura y diversidad total de la comunidad bacteriana asociada a este cultivo. De forma similar, los resultados del PCA de los parámetros físicos y químicos que agruparon a las fincas por región y sistema de siembra (capítulo 2) sugieren que las características físicoquímicas de los suelos de las fincas están determinadas por prácticas agronómicas como el sistema de siembra, pero a su vez, y de forma más significativa, por la región. Trabajos como los de Gelsomino *et al.* (1999), Johnson *et al.* (2003), Girvan *et al.* (2003) y Ge *et al.* (2008) han puesto de relieve la importancia del tipo de suelo y material parental en la estructura y la comunidad de bacterias edáficas. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que en cada región algunas prácticas agronómicas se han mantenido de forma histórica

en el tiempo, y son de cierta forma contrastantes para los dos departamentos. Esto lleva a la pregunta de si las diferencias fisicoquímicas de los suelos entre regiones se deben fundamentalmente al material parental o, además del material parental, a las prácticas agronómicas que, sostenidas durante años, han determinado en parte las características físico-químicas que presentan los suelos actualmente.

En el caso de los hongos, el análisis de componentes principales (ACP) (datos no mostrados) no reveló ningún tipo de correlación entre la estructura de las comunidades de hongos y las variables físicas y químicas, lo que puede estar indicando que los hongos responden o son más sensibles a otras variables no analizadas en este estudio. Johnson *et al.* (2003) reportan igualmente la falta de correlación entre la estructura de las comunidades de hongos y las variables fisicoquímicas y ambientales evaluadas.

Los hongos son microorganismos ubicuos en el suelo, los cuales llevan a cabo una serie de funciones importantes, particularmente aquellas relacionadas con el ciclaje de nutrientes y carbono en el ecosistema edáfico (Anderson y Carney, 2004). Sin embargo, a pesar de su relevancia, es poco lo que se conoce en términos de estructura y función respecto de la comunidad. Esto se debe, entre otras causas, a que su estudio ha sido fundamentado en técnicas dependientes de cultivo o perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos (Boyle *et al.*, 2008), que dan una visión muy general y parcial de los hongos en el ecosistema. Por otra parte, la relación biomasa/función no es muy clara, dadas las características de crecimiento micelial y producción de esporas, que dificultan la interpretación de los resultados en términos de la estimación de las poblaciones de hongos (Stricklan y Rousk, 2010). Además, específicamente para el ecosistema arroz, la predominancia de hongos es relativamente baja, dada su condición de microorganismo aerobio, ya que bajo este cultivo el oxígeno es una condición limitante durante buena parte del período de siembra (Eickhorst *et al.*, 2010). No obstante, cabe mencionar que en el presente estudio se pudo evidenciar una relativamente alta diversidad de hongos rizosféricos asociada al cultivo de arroz, lo cual es reflejado por el número de OTU identificados para cada finca (tabla 6.2), los cuales, contrario a los resultados de otros autores (Johnson *et al.*, 2003), presentaron valores similares a los encontrados para las bacterias (tabla 6.1).

Conclusiones

El análisis de la comunidad microbiana en cultivos de arroz en las zonas bajo estudio indica que:

1. La estructura de la comunidad procariótica está determinada principalmente por las condiciones físico-químicas del suelo, las cuales están determinadas, a su vez, por el origen del mismo, y en menor medida por las prácticas de manejo del cultivo.

2. El marcador molecular del gen 16S rDNA es más adecuado (en comparación con el marcador de ITS) para identificar diferencias en términos de las características físico-químicas del suelo o sistema de manejo, lo cual indica una relación más estrecha entre dichas características y la población de microorganismos procariotas en los suelos de cultivos de arroz evaluados en este estudio.
3. Dada la estrecha relación entre los factores físicos y químicos y la distribución de microorganismos de origen bacteriano, se sugiere que la aplicación de enmiendas bacterianas para la mejora de la fertilización del cultivo de arroz debe tener en consideración las condiciones físico-químicas del suelo para asegurar una mejor eficiencia en la acción de estas enmiendas.
4. Los resultados de este trabajo permiten concluir igualmente que los suelos de cultivos de arroz estudiados presentan una alta diversidad de hongos representados por el número de OTU por finca para este grupo de microorganismos.

Finalmente, a la luz de los resultados de este trabajo, se recomienda evaluar los cambios en la estructura y diversidad de bacterias y hongos mediante la selección de diferentes marcadores moleculares funcionales (genes de: nitrogenasas, fosfatasa, rutas de degradación de compuestos xenobióticos, celulasas, entre otros), haciendo un diseño de experimentos que permitan responder preguntas puntuales (e.g. efecto de una estrategia de fertilización o de una enmienda química o microbiana sobre la producción de un cultivo de arroz), con el objeto de obtener información más concluyente en términos de los índices de rendimiento del cultivo, relacionando las comunidades de bacterias y hongos con sus funciones ecológicas, y estas con estrategias específicas de manejo agrícola en cultivos de arroz comercial.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo manifiestan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, entidades que cofinanciaron este trabajo a través del contrato 2007B6423 161-1020/2007.

Referencias

- Anderson, I., Campbell, C., & Prosser, J. (2003). Diversity of fungi in organic soils under a moorland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environmental Microbiology*, 5, 1121-1132.
- Anderson, I. C., & Carney, J. W. G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6, 769-779.

- Asakawa, S., & Kimura, M. (2008). Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1322-1329.
- Bodelier, P., Roslev, P., Henckel, T., & Frenzel, P. (2000). Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature*, 40, 421-424.
- Borresen, A., Hovig, E., & Brogger, A. (1988). Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes. *Mutation Research*, 202, 77-83.
- Boyle, S. A., Yarwooda, R. R., Bottomley, P. J., & Myrold, D. D. (2008). Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 443-451.
- Buckley, D., & Schmidt, T. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5, 441-452.
- Chen, W., Yen, J., Chang, C., & Wang, Y. (2009). Effects of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 120-127.
- Das, A., & Debnath, A. (2006). Effect of systemic herbicides on N₂-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. *Chemosphere*, 65, 1082-1086.
- Del Castillo, I. (2010). *Estudio de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados al cultivo de arroz y evolución de la diversidad microbiana característica en las Marismas del Guadalquivir*. Tesis doctoral. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
- DeLong, E., & Pace, N. (2001). Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology*, 50, 470-478.
- Doi, T., Hagiwara, Y., Abe, J., & Morita, S. (2007). Analysis of rhizosphere bacteria of rice cultivated in Andosol lowland and upland fields using molecular biological methods. *Plant Root*, 1, 66-74.
- Duineveld, B., Kowalchuk, G., Keijzer, A., Van Elsas, J., & Van Veen, J. (2001). Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rRNA as well as dna fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 172-178.
- Eickhorst, T., Remesch, M., Kuever, J., & Tippkötter, R. (2010). *Soil solutions for a Changing World*. In 19th World Congress of Soil Science. Australia: Brisbane.

- Garbeva, P., van Veen, J., & van Elsas, J. (2004). Microbial diversity in soils: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review Phytopathology*, 42, 243-70.
- Ge, Y. *et al.* (2008). Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies? *ISME Journal*, 2, 254-264.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A., Cacco, G., & Van Elsas, J. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 38, 1-15.
- Girvan, M., Bullimore, J., Pretty, J., Osborn, M., & Ball, A. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1800-1809.
- Green, S., & Rubin, E. M. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Review Genetics*, 6, 805-814.
- Gu, Y., Zhang, X., Tu, S., & Lindström, K. (2009). Soil microbial biomass, crop yields, and bacterial community structure as affected by long-term fertilizer treatments under wheat-rice cropping. *European Journal of Soil Biology*, 45, 239-246.
- Hartmann, M., & Widmer, F. (2006). Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7804-7812.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3233-3241.
- Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Brogger, A., & Borresen, A. L. (1991). Constant denaturant gel electrophoresis, a modification of denaturing gradient gel electrophoresis, in mutation detection. *Mutation Research*, 262, 63-71.
- Johnson, M., Lee, K., & Scow, K. (2003). DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*, 114, 279-303.
- Kirk, J. *et al.* (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169-188.
- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 625-645.
- Lopes, A., Faria, C., Prieto-Fernández, A., Trasar-Cepeda, C., Manaia, C., & Nunes, O. (2011). Comparative study of the microbial diversity of bulk paddy soil of two rice fields subjected to organic and conventional farming. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 115-125.
- Magurran, A. (1989). *Diversidad ecológica y su medición* (1.ª ed.). Barcelona: Ed. Veda.

- Murase, J., Noll, M., & Frenzel, P. (2006). Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5436-5444.
- Muthukumarasamy, R. *et al.* (2007). Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 981-991.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 317-322.
- Muyzer, G., De Waal, E., & Uitterlinden, A. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Nakatsu, C., Torsvik, V., & Ovrea, L. (2000). Soil community analysis using dgge of 16s rdna polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 1382-1388.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- Nicolaisen, M., Risgaard-Petersen, N., Revsbech, N., Reichardt, W., & Ramsing, N. (2004). Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 359-369.
- Nielsen, M., & Winding, A. (2002). Microorganisms as Indicators of soil Health. *Technical Report 388*.
- Nocker, A., Burr, M., & Camper, A. K. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, 54, 276-289.
- Nogueira, M. *et al.* (2006). Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 115, 237-247.
- Shannon, D., Sen, A., & Johnson, D. (2002). A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. *Soils Use and Management*, 18, 274-283.
- Singh, B. *et al.* (2006). Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soils Science*, 57, 72-82.
- Strickland, M. S., & Rousk, J. (2010). Considering fungal:bacterial dominance in soils: Methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1385-1395.
- Torsvik, V., Daae, F., Sandaa, R., & Ovreas, L. (1998). Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64, 53-62.

- Torsvik, V., & Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240-245.
- Tringe, S. et al. (2005). *Comparative Metagenomics of Microbial Communities Science*, 308, 554-557.
- Uribe-Vélez, D., & Flórez-Zapata, N. (2011). Aplicación de la metagenómica y otras aproximaciones para la comprensión de la ecología microbiana del suelo en ecosistemas agrícolas. En M. Seager (Ed.). *Avances en el estudio de la genómica funcional*. Red Iberoamericana de Biotecnología. En prensa.
- Wartiainen, L., Eriksson, T., Zheng, W., & Rasmussen, U. (2008). Variation in the active diazotrophic community in rice paddy nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 39, 65-75.
- Watanabe, T., Kimura, M., & Asakawa, S. (2006). Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1264-1274.
- Wenhui, Z., Zucong, C., Lichu, Y., & He, Z. (2007). Effects of the long-term application of inorganic fertilizers on microbial community diversity in rice-planting red soil as studied by using PCR-DGGE. *Acta Ecológica Sinica*, 27, 4011-4018.
- Winding, A., Hund-Rinke, K., & Rutgers, M. (2005). The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 230-248.
- Woese, C. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Review*, 51, 221-271.
- Woese, C., Kandler, O., & Wheelis, M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4576-4579.
- Zheng, S., Yao, J., Zhao, B., & Yu, Z. (2007). Influence of agricultural practices on soil microbial activity measured by microcalorimetry. *European Journal of Soil Biology*, 43, 151-157.

Evaluación en campo de microorganismos promotores del crecimiento y celulolíticos

Francy Marentes¹, Javier Vanegas¹,
José Neftalí Luna², Daniel Uribe-Vélez*

¹ Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.

² Federación Nacional de Cultivadores de Arroz, Fedearroz,
Seccional Acacias, Meta.

• duribev@unal.edu.co

El cultivo intensivo de arroz en Colombia ha conducido al deterioro de las propiedades físicas y químicas del suelo, una reducción en la productividad y una baja eficiencia de la fertilización (Fedearroz, 2000). Esta situación ha llevado al empleo de grandes cantidades de fertilizantes, lo que hoy día representa entre el 15,6 % y el 13,5 % de la inversión en el cultivo (Vallejo *et al.*, 2008; Espinal *et al.*, 2005). Una alternativa para mitigar el deterioro de los suelos en cultivos como el arroz ha sido la incorporación de diferentes prácticas que incluyen el uso de abonos verdes, la rotación de cultivos y la incorporación del tamo en el suelo (Doberman y Fairhurst, 2000). Así mismo, para aumentar la disponibilidad de nutrientes y reducir las concentraciones de fertilizantes, se ha implementado el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PCV), solubilizadores de fosfato (MSF) (Kennedy *et al.*, 2004; Rodríguez y Fraga, 1999) y la aplicación de microorganismos degradadores de celulosa y lignina en cultivos de arroz (Garcés y Ospina, 2009; Ponnampereuma, 1984).

La quema del tamo del arroz es una práctica ampliamente empleada en los países productores a nivel mundial, la cual, si bien presenta algunas ventajas en términos del mantenimiento de la sanidad del cultivo y la disminución de los tiempos de preparación de la cosecha, también conduce a la pérdida de una fracción importante de los nutrientes y al deterioro de la materia orgánica (Doberman y Fairhurst, 2000). Esta pérdida se debe fundamentalmente a que el tamo de arroz contiene alrededor del 40 % del N, entre el 80-85 % del K, el 30-35 % del P, el 40-50 % del azufre y entre el 5-6 % del silicio acumulado en la biomasa vegetal durante un ciclo de cultivo. De estos nutrientes, casi la

totalidad del N, el 25 % del P, el 20 % del K y entre el 5-60 % del S se pierden por la quema del tamo (Doberman y Fairhurst, 2000). En este contexto, una vía para disminuir el deterioro de los suelos bajo cultivo intensivo consiste en la incorporación de residuos vegetales como el tamo una vez terminada la cosecha.

La incorporación del tamo permite la degradación de la lignina y celulosa, lo cual facilita la disponibilidad de nutrientes y estimula la actividad microbiana del suelo (Bronick y Lal, 2005; Vargas-García *et al.*, 2010). Igualmente, protege el suelo de los rayos del sol y controla las malezas. Usualmente, la descomposición de los residuos vegetales toma bastante tiempo (Aro *et al.*, 2005); sin embargo, el empleo de microorganismos degradadores de celulosa como *Trichoderma*, particularmente *T. viride* y *T. harzianum*, pueden disminuir estos tiempos de degradación (Royer y Nakas, 1989; Garcés y Ospina, 2009; Kausar *et al.*, 2010).

Algunas inoculaciones con bacterias fijadoras de nitrógeno pueden complementar los requerimientos de N en cultivos de arroz, además de promover su crecimiento (Choudhury y Kennedy, 2004). Resultados similares se han registrado para el fósforo empleando microorganismos solubilizadores de fosfato (Tiwari *et al.*, 1989; Rodríguez y Fraga, 1999). Sin embargo, se han reportado discrepancias en los resultados de promoción de crecimiento por inoculaciones con microorganismos bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo (Bashan *et al.*, 2004; Çakmakç *et al.*, 2006; Lucy *et al.*, 2004). Esto obedece a relaciones no específicas con el hospedero, diferencias físico-químicas en relación con el ambiente en el que fue aislado el inoculante, formulación deficiente y baja capacidad de competencia ante poblaciones nativas del suelo donde es aplicado el inoculante microbiano (Lucy *et al.*, 2004).

Para que exista efecto positivo de la inoculación, los microorganismos PCV deben colonizar la raíz, sobrevivir, multiplicarse y competir en la rizósfera (Barea *et al.*, 2005; Bashan *et al.*, 2004). La supervivencia de este tipo de microorganismos depende del contenido de materia orgánica, la fracción arcillosa (Bashan *et al.*, 2004), el tipo de suelo, el balance de agua, las prácticas agrícolas como la fertilización, el control químico de enfermedades y el genotipo vegetal que es inoculado (Fages, 1994). Dadas todas las interacciones que se puedan dar para obtener un efecto positivo en la inoculación bacteriana, es necesario desarrollar ensayos que permitan caracterizar las condiciones favorables bajo las cuales se potencie la actividad del inoculante.

A continuación se presentan dos casos de estudio. En el primer caso, el objetivo fue evaluar el crecimiento y el rendimiento de un cultivo de arroz previamente soqueado, al incorporar tamo inoculado con un microorganismo celulolítico y una posterior aplicación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en el departamento de Tolima. En el segundo caso,

el objetivo fue determinar el efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal sobre el crecimiento y el rendimiento de un cultivo de arroz en el departamento de Meta.

Estudio de caso 1. Efecto de la incorporación del tamo con un microorganismo celulolítico y posterior inoculación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en un cultivo de arroz previamente soqueado en el departamento de Tolima, municipio de Saldaña

Este experimento se realizó en la finca “El caucho” 3°53’38”N, 74°59’47”W, localizada en el municipio de Saldaña, departamento de Tolima. Altitud de 325 msnm y temperatura entre los 27,0 y 28,5 °C (Saldaña, 2010). El suelo de esta finca presentó textura franco arcillosa, pH ligeramente ácido y nivel medio de materia orgánica. Los niveles de calcio (Ca), magnesio (Mg), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn) y sodio (Na) fueron apropiados para el desarrollo del arroz; sin embargo, las concentraciones de azufre (S) fueron bajas, y se encontraron deficiencias de potasio (K), fósforo (P), hierro (Fe) y boro (B) de acuerdo con las relaciones entre cationes (Microfertisa, 2005).

El ensayo fue desarrollado en un cultivo de soca (rebrote del cultivo de arroz después de haber recogido la primera cosecha) de la variedad Fedearroz 733, cultivado bajo un sistema inundado. La soca se cortó con una guadaña a una altura de 10-15 cm del suelo para uniformizar el tamaño del tamo (figura 7.1). Posteriormente, el terreno fue dividido en dos parcelas experimentales de 1.250 m² cada una (figura 7.2). Una de estas parcelas se inoculó con el hongo celulolítico *Trichoderma viride* (Trifisol[®]), el cual, además de su capacidad antagonista contra agentes fitopatógenos, posee actividad celulolítica. La aplicación se realizó bajo condiciones de campo, a la dosis comercial de 1 L.ha⁻¹ a una concentración de 4 x 10⁶ ufc.ml⁻¹ (figura 7.1). Un mes después de aplicado el *T. viride* para degradar el tamo, se inocularon los microorganismos PCV y MSF en las dos parcelas experimentales. El diseño experimental para cada parcela (con y sin *Trichoderma viride*) consistió en un diseño en bloques al azar, con cuatro réplicas por cada tratamiento; el área de cada réplica constó de 33 m² (6,0 m x 5,5 m) (figura 7.2). Posteriormente, para identificar el efecto de la aplicación con y sin *T. viride*, se empleó un análisis de ANOVA simple, comparando el tratamiento específico en cada parcela. El plan de fertilización seguido para ambas parcelas fue de 70 kg de N ha⁻¹ y 30 kg de K₂O ha⁻¹, que fueron aplicados un mes después de cortar el tamo con guadaña.

Para el desarrollo de este experimento se utilizaron dos aislamientos bacterianos identificados como IBUN-PGPR-6.2 (*Bacillus sp.*) e IBUN-PGPR-E32 (*Enterobacter sp.*), los cuales se caracterizaron por promover el crecimiento de arroz bajo condiciones de invernadero. Igualmente, la cepa IBUN-PGPR-6.2 presentó una producción de 73,98 µg.ml⁻¹ de ácido indolacético,



A

B

Figura 7.1 A: Cultivo de soca luego del corte con guadaña, empleado para realizar el montaje del ensayo de incorporación del tamo de arroz en Saldaña, Tolima. B: Soca de arroz luego de 30 días de crecida; se muestran los rebrotes de la planta de arroz a través del tamo en descomposición.

Fuente: Fotos Daniel Uribe-Vélez

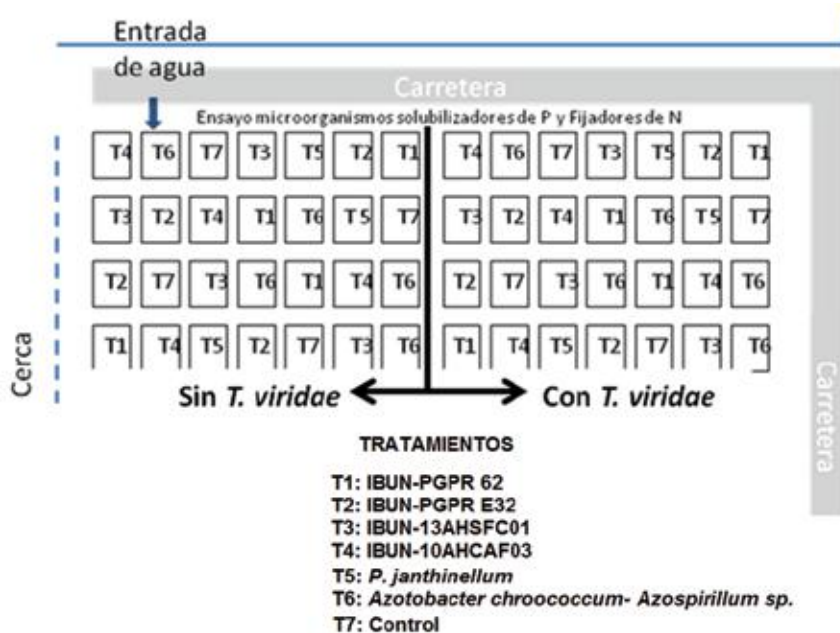


Figura 7.2 Diseño experimental de los tratamientos empleados en campo para la evaluación del efecto de la incorporación de residuos vegetales (tamo) empleando un microorganismo celulolítico en un cultivo de soca, y posterior suplemento con enmiendas de microorganismos PCV y MSF.

Fuente: autores

mientras la cepa IBUN-PGPR-E32 manifestó una actividad nitrogenasa de 24,44 nmoles de etileno.h⁻¹. Los MSF IBUN-13HSFC01 e IBUN-10HCAFO3 fueron seleccionados por su capacidad de solubilización de roca fosfórica como sustratos con valores de 87 y 59 mg de P₂O₅ por ml, respectivamente. Como tratamiento control positivo de los PCV se usó el producto comercial de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum* sp., que contiene los microorganismos, mientras que el tratamiento control positivo para los MSF fue una formulación comercial de *Penicillium janthinellum*. Al control negativo no se le realizó ninguna aplicación microbiana.

Las bacterias PCV fueron crecidas en caldo LB a 30 °C a 150 rpm durante 48 h. Luego, fueron lavadas en agua destilada estéril y resuspendidas en LB diluido 10 veces para su almacenamiento a 4 °C. La suspensión bacteriana fue aplicada en un volumen de 2 litros por parcela en forma de suspensión, a una concentración final de 1,73 x 10⁷ ufc.ml⁻¹ para IBUN-PGPR-6.2 y 4,39 x 10⁸ UFC.ml⁻¹ para IBUN-PGPR-E32. Los MSF fueron crecidos en el medio agar Sabouraud Dextrosa a 25 °C durante 8 d y suspendidos en Tween 80^o al 0,03 %, a una concentración de 2 x 10⁸ conidias.ml⁻¹ por conteo en cámara de Neubauer. Dos litros de la suspensión de hongos para los aislamientos IBUN-13HSFC01 y para IBUN-10HCAFO3 fueron aplicados a una concentración final de 1,0 x 10⁸ conidias.mL⁻¹. Los controles positivos fueron aplicados de acuerdo con las dosis sugeridas por la casa comercial, que consiste en 100 litros por hectárea de una concentración de 1 x 10⁶ ufc.ml⁻¹ para *A. chroococcum* y *Azospirillum* sp., y 1 x 10⁶ conidias.ml⁻¹ para *P. janthinellum*.

Como variables respuesta del efecto de la inoculación se determinó la altura de planta (desde el suelo hasta el extremo superior de la hoja bandera), el rendimiento del grano en 4 m² y los siguientes componentes de rendimiento: número de granos por panícula, peso de 1.000 granos, porcentaje de vaneamiento.m⁻² (medido en un cuadrante de 0,25 m x 0,25 m) y número de panículas.m⁻² (0,5 m x 0,5 m). Igualmente, se determinaron los parámetros de calidad molinera como índice de pilada o porcentaje de grano entero, porcentaje de grano partido, porcentaje de grano yesado y porcentaje de grano con centro blanco. En ningún tratamiento se encontraron daños significativos por agentes patógenos.

Los datos obtenidos fueron analizados con los paquetes estadísticos Minitab 16 Statistical Software (1986) y STATGRAPHICS Plus Versión 5.1 (2001) a través de un análisis de varianza ($p \leq 0,05$), verificando el cumplimiento de las premisas del ANOVA, como la normalidad y la homogeneidad de la varianza. Las medias de los tratamientos con diferencias significativas fueron comparadas por la prueba de medias de Duncan ($p \leq 0,05$). Los datos que no cumplieron con las premisas del ANOVA, fueron comparados por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952).

Resultados de crecimiento, rendimiento y calidad molinera

Los resultados muestran que los tratamientos con el hongo celulolítico *T. viride* presentaron incrementos en todas las variables de crecimiento, rendimiento y de molinería (tablas 7.1 y 7.2), con excepción del número de panículas.m⁻² con la cepa IBUN13HSFC01 (tabla 7.1). Es posible que la falta de incremento en el tratamiento con este aislamiento haya sido producto de una acción antagónica entre *T. viride* y la cepa IBUN13HSFC01, lo que pudo generar un efecto contrario al observado en los demás tratamientos.

Todos los tratamientos inoculados con *T. viride* presentaron incrementos significativos en la altura de la planta en relación con los mismos tratamientos no inoculados con *T. viridae*. Los incrementos oscilaron entre 9,01 % (control) y 15,94 % (*A. chroococcum* y *Azospirillum sp.*). Similares resultados se presentaron para el número de panículas.m⁻², con incrementos significativos entre 13,4 % para el tratamiento con *Azotobacter* y *Azospirillum sp.*, y 36,7 % para el tratamiento con el aislamiento IBUN-PGPR-E32. La excepción la mostraron los tratamientos inoculados con los aislamientos IBUN-PGPR-6.2 e IBUN13HSFC01, que si bien evidenciaron un mayor número de panículas.m⁻² en relación con el tratamiento sin *T. viridae*, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que la inoculación de *T. viride* al tamo mejoró el vigor de las plantas de arroz, posiblemente debido a una mejor disponibilidad de nutrientes producto de la liberación de los mismos por la degradación del tamo. Merece mencionar que muy posiblemente dicho efecto se vio favorecido por los bajos niveles de fertilización aplicados durante el ciclo de cultivo.

El peso de 1.000 granos y el número de granos por panícula indicaron incrementos en todos los tratamientos inoculados con *T. viride*, aunque únicamente en la aplicación de los aislamientos IBUN-PGPR-6.2 (7,4 %) e IBUN-PGPR E32 (26,0 %) dichas diferencias fueron estadísticamente significativas, para el número de granos por panícula (tabla 7.1). En otros estudios se ha demostrado que el aumento en el número de granos por panícula puede ser debido al incremento de N durante diferentes estados de desarrollo del arroz (Kumura, 1956; Matsuo *et al.*, 1995). Igualmente, Wilson *et al.* (1998), reportaron que el número de panículas y el número de granos por panícula en arroz están determinados por las aplicaciones de fertilizantes antes de la inundación permanente del cultivo. En este contexto, es probable que la descomposición acelerada del tamo por el hongo *T. viride* haya aportado una proporción significativa de nutrientes en la fase inicial del cultivo, en especial de N, lo cual explicaría los incrementos en el número de granos por panícula. Igualmente, los microorganismos PCV IBUN-PGPR-E32 e IBUN-PGPR6.2 podrían contribuir a mejorar la asimilación de nitrógeno, bien sea por efecto de su capacidad de fijación de nitrógeno o por su capacidad

Tabla 7.1 Componentes del rendimiento con y sin la aplicación de *T. viride* en el tamo, y posterior inoculación de microorganismos PCV y MSF en el cultivo.

Inoculante	<i>T. viride</i> ^x	Altura planta (cm)	Peso de 1.000 granos	Granos. Panícula ⁻¹	Vaneamiento (%)	Número de panículas.m ⁻²	Rendimiento (t/ha)
IBUN-PGPR-6.2	+	103,13 ± 1,16 ^a a ^z	25,66 ± 3,98 a	80 ± 5,2 a	2,00 ± 0,47 a	496 ± 41,6 a	5,73 ± 0,45 a
	-	92,95 ± 1,01 b	18,25 ± 0,78 a	67 ± 1,5 b	2,48 ± 1,24 a	448 ± 23,5 a	4,34 ± 0,15 b
IBUN-PGPR-E32	+	97,31 ± 1,15 a	24,75 ± 1,05 a	92 ± 3,8 a	4,05 ± 1,58 a	589 ± 14,8 a	6,02 ± 0,64 a
	-	87,62 ± 0,83 b	19,63 ± 2,78 a	66 ± 3,5 b	2,11 ± 1,40 a	431 ± 20,9 b	4,55 ± 0,10 a
IBUN13HSFC01	+	101,43 ± 1,31a	25,13 ± 1,46 a	78 ± 6,6 a	2,37 ± 1,46 a	420 ± 52,0 a	5,73 ± 0,85 a
	-	92,38 ± 0,99 b	20,88 ± 2,49 a	67 ± 4,3 a	2,76 ± 1,66 a	496 ± 17,0 a	4,73 ± 0,33 a
IBUN10HCAF03	+	99,92 ± 0,99 a	23,00 ± 3,92 a	99 ± 7,1 a	2,57 ± 0,63 a	543 ± 21,5 a	5,77 ± 0,31 a
	-	89,75 ± 1,02 b	20,88 ± 3,83 a	80 ± 16,3 a	6,73 ± 1,94 a	408 ± 27,0 b	4,77 ± 0,34 b
<i>P. janthinellum</i>	+	100,78 ± 0,97 a	23,50 ± 1,60 a	93 ± 4,5 a	7,05 ± 3,39 a	543 ± 21,5 a	5,56 ± 0,23 a
	-	89,33 ± 0,96 b	22,75 ± 2,26 a	84 ± 8,0 a	2,48 ± 0,97 a	429 ± 40,4 b	5,11 ± 0,38 a
<i>A. chroococcum</i> y <i>Azospirillum</i> sp.	+	102,87 ± 1,08 a	22,25 ± 1,61 a	80 ± 4,9 a	4,03 ± 0,87 a	515 ± 55,1 a	5,70 ± 0,10 a
	-	88,73 ± 0,79 b	20,63 ± 1,09 a	74 ± 3,3 a	2,64 ± 1,27 a	454 ± 37,0 b	4,70 ± 0,21 b
Control	+	100,02 ± 1,12 a	24,88 ± 1,64 a	88 ± 6,0 a	6,31 ± 2,32 a	528 ± 25,0 a	6,15 ± 0,45 a
	-	91,75 ± 0,89 b	18,38 ± 1,83 b	71 ± 7,2 a	4,89 ± 1,74 a	422 ± 15,9 b	4,51 ± 0,26 b

^x (+) Se aplicó *T. viride*; (-) No se aplicó *T. viride*; ^y Error estándar; ^z Medias de la misma columna seguidas por la misma letra no muestran diferencias significativas entre estas (p ≤ 0,05). Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó una prueba de comparación de medias de Duncan (p ≤ 0,05). N = 4.

Fuente: autores

De acuerdo con los resultados, el incremento en el rendimiento en los tratamientos con *T. viride* estuvo estrechamente relacionado con un incremento en el peso de 1000 granos y el n.º granos/panícula⁻¹. Kumura (1956) demostró una correlación positiva entre el número de granos por panícula y el contenido de nitrógeno en las hojas durante el estado de iniciación de primordio de panícula. Investigaciones adelantadas en la estación nacional de experimentación agrícola en Hokkaido y Kyushu (Japón) demostraron que es posible aumentar el número de granos por unidad de área, aumentando en gran medida la absorción de nitrógeno en etapas desde estado de germinación de semilla hasta estado de diferenciación tardía los granos (Matsuo et al., 1995). Wilson et al. (1998) establecieron que el número de panículas y el número de granos por panícula estaban determinados por las aplicaciones antes de inundación con lámina permanente. Es probable que la descomposición más acelerada del tamo estimulada por *T. viride*, aportará una cierta proporción de nutrientes al cultivo, que lo estimuló desde antes de que se realizara la inundación de la soca.

Tabla 7.2. Calidad de molinería con y sin la aplicación de *T. viride* en el tamo, y posterior inoculación de microorganismos PCV y MSF en el cultivo.

Tratamiento	*T.	Grano integral (%)	Rendimiento en molino (%)	Índice de pilada	Grano partido (%)	Grano yesado (%)	Centro blanco (%)
IBUN- PGPR-6.2	+	78,50 ± 0,50 y a ^z	70,67 ± 0,44 ^a	58,33 ± 1,83 b	9,33 ± 2,20 a	0,26 ± 0,01 a	1,70 ± 0,26 a
	-	77,88 ± 0,38 a	71,88 ± 0,43 a	67,90 ± 0,43 a	4,00 ± 0,68 b	0,98 ± 0,74 a	2,30 ± 0,66 a
IBUNP-CPR-E32	+	78,67 ± 0,33 a	72,17 ± 0,17 a	63,83 ± 3,22 a	8,33 ± 3,11 a	0,29 ± 0,04 a	1,45 ± 0,35 a
	-	78,38 ± 0,24 a	71,75 ± 0,32 a	67,90 ± 0,32 a	3,90 ± 0,72 a	0,32 ± 0,07 a	2,80 ± 0,45 a
IBUN-13HSFC01	+	78,17 ± 0,17 a	72,17 ± 0,60 a	66,50 ± 3,00 a	5,67 ± 2,42 a	0,40 ± 0,02 a	2,54 ± 0,59 a
	-	78,38 ± 0,4 a	72,25 ± 0,32 a	67,5 ± 0,32 a	4,80 ± 0,52 a	0,24 ± 0,08 a	2,50 ± 0,38 a
IBUN-10HCAF03	+	78,33 ± 0,44 a	71,67 ± 0,44 a	64,83 ± 1,86 a	6,83 ± 1,42 a	0,26 ± 0,07 a	2,24 ± 0,31 a
	-	78,38 ± 0,3 a	71,50 ± 0,20 a	66,3 ± 0,20 a	5,30 ± 0,97 b	0,48 ± 0,15 a	2,70 ± 0,23 a
<i>P. janthinellum</i>	+	78,67 ± 0,17 a	71,17 ± 0,33 a	62,50 ± 2,02 b	8,67 ± 1,74 a	0,28 ± 0,04 a	1,37 ± 0,10 a
	-	78,13 ± 0,24 a	72,00 ± 0,20 a	67,60 ± 0,20 a	4,40 ± 0,24 b	0,34 ± 0,05 a	2,20 ± 0,35 a
<i>A. chroococcum</i> <i>Azospirillum sp</i>	+	78,33 ± 0,17 a	70,83 ± 1,01 a	61,67 ± 2,32 a	9,17 ± 1,30 a	0,33 ± 0,03 a	1,65 ± 0,31 a
	-	78,25 ± 0,14 a	71,50 ± 0,20 a	66,50 ± 0,20 a	5,00 ± 0,54 a	0,38 ± 0,04 a	2,40 ± 0,52 a
Control	+	78,17 ± 0,17 a	71,33 ± 0,33 a	65,50 ± 0,87 a	5,83 ± 0,60 a	0,40 ± 0,09 a	2,29 ± 0,40 a
	-	78,50 ± 0,20 a	71,88 ± 0,43 a	67,0 ± 0,43 a	5,10 ± 0,97 a	0,29 ± 0,07 a	2,00 ± 0,45 a

(+) Se aplicó *T. viride*; (-) No se aplicó *T. viride*; ^z Error estándar; ^a Medias de la misma columna seguidas por la misma letra no muestran diferencias significativas entre estas (p ≤ 0,05). Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó una prueba de comparación de medias de Duncan (p ≤ 0,05). N = 4

Fuente: autores

de estimular el crecimiento radicular, características que afectan positivamente la capacidad de asimilación de nutrientes para la planta.

La aplicación de *T. viride* no presentó efectos significativos sobre el porcentaje de vaneamiento (tabla 7.1). Con respecto al rendimiento, se encontraron incrementos superiores al 8,1 %, en todos los tratamientos inoculados con *T. viride*, cuatro de los cuales fueron estadísticamente significativos con incrementos superiores al 21 % (tabla 7.1).

Los resultados de este estudio indican que la inoculación de la soca con el hongo celulolítico *T. viride* tuvo incidencia positiva sobre el vigor de la planta, probablemente debido al efecto sobre la liberación y posterior asimilación de nutrientes por la planta. En este sentido, cabe señalar que en otros estudios se ha logrado determinar que los microorganismos celulolíticos al descomponer el tamo aumentan la disponibilidad de nutrientes como el C, N, P, K, así como los demás macro y micronutrientes atrapados en la biomasa vegetal (Mirchink, 1988; Rudresh *et al.*, 2005; Kurakov *et al.*, 2006), nutrientes que bajo prácticas como la quema son mayoritariamente perdidos para el cultivo (Doberman y Fairhurst, 2000). Por otra parte, una mayor disponibilidad de carbono permite mejorar la actividad microbiana asociada a la solubilización y translocación de fósforo, la excreción de reguladores de crecimiento vegetal y la fijación de N, efectos que posiblemente se potenciaron en este estudio por la baja fertilización inorgánica aplicada en este cultivo (70 kg de N ha⁻¹ y 30 kg de K₂O ha⁻¹).

En cuanto a las variables de calidad de molinería, se puede mencionar que los tratamientos con *T. viride* presentaron menor índice de pilada, especialmente en los tratamientos inoculados con los aislamientos IBUN-PGPR-6.2 y *P. janthinellum* (tabla 7.2). Con respecto al porcentaje de grano partido, solo se encontraron diferencias significativas cuando se aplicó *T. viride* con la cepa IBUN-PGPR-6.2 y *P. janthinellum*. Para el porcentaje de grano yesado y grano con centro blanco no se hallaron diferencias significativas en ningún tratamiento. Los valores obtenidos de calidad de molinería fueron similares a los reportados por Arévalo (2009) para índice de pilada (63,4-67,1) y porcentaje de grano yesado (menor del 3 %) en la cultivariedad Fedearroz 733; sin embargo, los valores obtenidos para porcentaje de grano partido (8,5 % a 12,8 %) y grano con centro blanco (8,8 % a 27 %) fueron menores a los reportados por Arévalo (2009).

Estudio de caso 2. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PCV) y microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) en plantas de arroz en el departamento de Meta, municipio de Castilla Nueva

El segundo ensayo se estableció en el departamento de Meta, municipio de Castilla Nueva, en la finca “Capachos” (3°48′0,99N, 73°29′19,5″W). En esta finca el cultivo de arroz es intensivo y se desarrolla bajo condiciones de inundación. El lote tiene un área de 20 ha, de las cuales se dispusieron 1.500 m² para llevar a cabo el ensayo. La temperatura promedio anual en la zona es de 24 °C y pluviosidad de 2000 mm. Los suelos de la finca presentan textura franco limosa, pH fuertemente ácido, bajos niveles de MO y baja fertilidad por deficiencia en la relación iónica de Ca, K, Mg, Fe, B y Zn (Microfertifera, 2005).

Para el ensayo en campo se evaluaron dos grupos funcionales: microorganismos PCV y MSF. El primer grupo incluyó la cepa IBUN-PGPR-C9 identificada mediante el marcador molecular 16SrDNA como un *Enterobacter sp.*, la cual produce compuestos tipo indoles a una concentración de 181,48 µg.mL⁻¹ en medio LB suplementado con triptófano 0,3 mM. Así mismo se evaluó la mezcla de los microorganismos IBUN-PGPR-C5/IBUN-PGPR-C6/IBUN-PGPR-C7 aislados de suelos arroceros. El aislamiento IBUN-PGPR-C5 fue identificado como *Enterobacter sp.*, el aislamiento IBUN-PGPR-C6 como *Lactococcus sp.* y el aislamiento IBUN-PGPR-C7 como *Chryseobacterium sp.* Los aislamientos IBUN-PGPR-C5, C6 y C7 presentan producción de indoles de 141,08, 133,24 y 37,55 µg.mL⁻¹, respectivamente. Estudios previos de los aislamientos IBUN-PGPR-C9 y la mezcla IBUN-PGPR-C5, C6 y C7 mostraron promoción de crecimiento en plantas de arroz bajo condiciones de invernadero en términos de incrementos en el peso seco en raíz con valores de 102 % y 70 %, respectivamente. Los MSF empleados en este ensayo (IBUN13HSFC01 e IBUN10HCAF03) fueron los mismos del ensayo anterior, los cuales, como ya se mencionó, se caracterizan por presentar alta actividad en términos de solubilización de fosfato, con roca fosfórica como sustrato.

El ensayo de campo se realizó empleando como control positivo de los aislamientos PCV una mezcla comercial de *A. chroococcum* y *Azospirillum sp.* a una concentración de 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Como control positivo de los MSF se empleó un inóculo comercial de *P. janthinellum* a una concentración de 1×10^7 esporas mL⁻¹. Por otra parte, se evaluó una formulación comercial de la micorriza *Glomus intraradices*, de la cual se aplicaron alrededor de 20.000 propágulos (esporas, micelio vegetativo y trocitos de raíces micorrizadas infectivas) por parcela experimental. El diseño del experimento consistió en bloques completos al azar con cuatro réplicas. Como unidad experimental se emplearon parcelas de 40 m² (10 m x 4 m) distanciadas por 1 m entre estas. Para este ensayo se empleó la variedad Fedearroz 174 a una densidad de siembra de 250 kg.ha⁻¹.

Los inóculos fueron producidos y preparados con el mismo procedimiento descrito para el estudio de caso 1. Para la aplicación de los microorganismos se empleó 1 kg de semillas de arroz certificada por cada parcela, luego de ser lavadas con detergente comercial y abundante agua para eliminar el fungicida comercial (Vitavax[®]). Las semillas fueron depositadas en bolsas herméticas donde se inocularon con 100 mL de suspensión microbiana ajustada a una concentración final de 1×10^9 UFC.mL⁻¹. Los inóculos con los MSF fueron aplicados de forma similar a una concentración de 2×10^9 UFC.mL⁻¹. Luego de 24 h, las semillas inoculadas fueron sembradas al voleo en cada parcela. A los 25 días de emergencia, las plántulas fueron re-inoculadas para asegurar que el inóculo estuviese disponible durante la fase vegetativa de la planta. En el caso de la re-inoculación con la cepa IBUNPGPR-C9 se aplicaron 2 L a 5×10^7 UFC.mL⁻¹ por parcela. En el caso de la aplicación de la mezcla IBUNPGPR-C5, C6, C7, las cepas fueron llevadas a concentración final de 5×10^7 UFC.mL⁻¹ en 2 L. El control comercial de los microorganismos PCV fue aplicado en una concentración de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ en 2 L por parcela, siguiendo la recomendación de la etiqueta.

Los MSF fueron aplicados en una concentración de 5×10^7 UFC.mL⁻¹ en 2 L por parcela, mientras que el control comercial de las MSF, en una concentración de 1×10^7 UFC.mL⁻¹ en 2 L por parcela, de acuerdo con la recomendación del producto comercial.

En los tratamientos con microorganismos PCV se realizó fertilización con 70 % de fertilizante nitrogenado (101,9 kg de N por ha) recomendado para la zona. En los tratamientos con MSF se fertilizó con la dosis completa de P utilizado en la zona (50,2 kg de P₂O₅). En los tratamientos control se aplicó fertilización completa de N (144,5 kg de N por ha) y P (50,2 kg de P₂O₅). El plan de fertilización se distribuyó en cinco períodos de abonada e incluyeron: K (150,0 kg de K₂O), Ca (23,4 kg ha⁻¹), Mg (7,8 kg ha⁻¹), S (10,2 kg ha⁻¹) y Zn (4,4 kg ha⁻¹).

Para determinar el efecto de la inoculación bacteriana sobre el crecimiento y la nutrición del arroz, se hizo un muestreo de biomasa aérea y análisis foliar de la hoja bandera en cada una de las parcelas. Las muestras fueron recolectadas 70 días después de emergencia utilizando un cuadro de 0,5 m x 0,5 m, el cual fue lanzado al azar en una área representativa de la parcela. Posteriormente, se determinó el peso seco de la biomasa aérea luego de mantener las plantas por 72 h a 70 °C, y la concentración foliar de N, P y K se estimó de acuerdo con los protocolos del Laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia.

En el momento de la cosecha se midió la altura de 15 plantas (desde el suelo hasta el extremo superior de la hoja bandera). El rendimiento de grano se determinó en un cuadro de 4 m² en cada parcela. En un cuadro de 0,25 m x 0,25 m se evaluó: número de granos.panícula⁻¹, peso de 1000 granos y

porcentaje de vaneamiento. El número de panículas.m⁻² fue estimado en un cuadro de 0,25 m². Igualmente, se establecieron los parámetros de calidad molinera: índice de pilada o porcentaje de grano entero, porcentaje de grano partido, porcentaje de grano yesado y porcentaje de grano con centro blanco.

Resultados de crecimiento, rendimiento y calidad molinera

Los diferentes tratamientos evaluados no presentaron diferencias significativas en los componentes de rendimiento (tabla 7.3). Sin embargo, al analizar en detalle algunas variables, se lograron identificar algunos efectos puntuales de las inoculaciones realizadas. En primer lugar, se obtuvieron incrementos en el número de granos por panícula del 29,6 %, 27,8 % y 20,4 % para la cepas IBUNPGPR-C9, IBUN10HCAFO3 y *P. janthinellum*, respectivamente. Estos incrementos en el número de granos por panícula podrían estar relacionados con una mejor asimilación de nutrientes tipo N y P por parte de la planta, como se ha demostrado en otros estudios similares en arroz (Kumura, 1956; Matsuo *et al.*, 1995 y Wilson *et al.*, 1998). Así mismo, cabe destacar el incremento en el número de panículas equivalente al 15 % con la cepa IBUN13HSFC01, ya que esta característica está igualmente asociada a una mejor asimilación de nutrientes en la etapa inicial del cultivo (Wilson *et al.*, 1998).

El incremento del número de granos por panícula llama la atención, particularmente para la cepa IBUNPGPR-C9, ya que el efecto sobre las panículas se presentó a pesar de que la fertilización en estos tratamientos correspondió a un 30 % menos de nitrógeno inorgánico. Estos resultados coinciden con otros reportes donde la aplicación de microorganismos PCV como *Azospirillum* sp. pueden reducir el uso de fertilizantes químicos, particularmente de N en un rango entre el 20-50 % (Bashan *et al.*, 2004). En el caso de la aplicación de microorganismos PCV, se ha reportado que el manejo de la fertilización es un elemento que presenta resultados contradictorios en las pruebas de campo, debido a que se ha encontrado que la promoción de crecimiento vegetal solo se da con la adición de fertilizantes (Okon y Labandera-González, 1994; Pedraza *et al.*, 2009), en tanto que otros informes han indicado promoción de crecimiento de microorganismos con *Azospirillum* sp. solo bajo condiciones limitantes de N (Omar *et al.*, 1992; Dobbelaere *et al.*, 2001) o en lugares de baja productividad con limitaciones de crecimiento para el cultivo (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009). Esta última condición es la que mejor tipifica los suelos evaluados en este estudio, los cuales presentan baja fertilidad y deficiencia en la mayoría de elementos.

El porcentaje de vaneamiento fue alto para todos los tratamientos (24,72% en promedio), posiblemente relacionado con los días nublados que se presentaron durante la maduración del grano. Incluso los tratamientos con micorriza y el aislamiento IBUNC9 mostraron altos valores (34,7 % y 27, 8%,

Tabla 7.3 Promedio de crecimiento, rendimiento y calidad de molinería por inoculación de microorganismos PCV y MSF para plantas de arroz Fedearroz 174.

Tratamiento	Altura planta (cm)	Granos. Panicula ¹	Vaneamiento (%)	Longitud de panicula (cm)	Número de paniculas.m ⁻²	Rendimiento (t/ha)
IBUN-C9	71,30 ¹ ± 1,21 ² a	70 ± 10,49 a	27,77 ± 4,55 a	18,90 ± 0,93 a	621 ± 56,68 a	3,26 ± 0,309 a
IBUN-C5/C6/C7	71,15 ± 0,89 a ³	60 ± 16,84 a	23,67 ± 5,56 a	18,93 ± 0,71 a	683 ± 56,68 a	3,29 ± 0,363 a
<i>A. chirococcum</i> y <i>Azospirillum</i> sp	71,17 ± 1,16 a	59 ± 16,09 a	24,00 ± 1,01 a	18,47 ± 1,17 a	609 ± 22,67 a	3,83 ± 0,373 a
IBUN-13HSFC01	71,53 ± 1,32 a	47 ± 11,00 a	22,10 ± 1,70 a	18,35 ± 0,75 a	768 ± 184,00 a	3,99 ± 0,052 a
IBUN-10HCAF03	67,98 ± 1,18 b	69 ± 10,33 a	20,10 ± 2,00 a	18,93 ± 0,58 a	665 ± 58,62 a	4,31 ± 0,124 a
<i>P. janthinellum</i>	68,08 ± 1,40 b	65 ± 3,51 a	22,50 ± 0,56 a	19,03 ± 0,18 a	696 ± 30,02 a	3,29 ± 0,373 a
Micorriza	65,90 ± 1,41 c	58 ± 5,70 a	34,73 ± 6,47 a	18,67 ± 0,43 a	660 ± 26,63 a	3,91 ± 0,189 a
Control	72,53 ± 1,29 a	54 ± 1,00 a	19,55 ± 5,65 a	18,65 ± 0,05 a	666 ± 42,00 a	3,73 ± 0,001 a

¹Promedio.
²Error estándar.
³Medias de la misma columna seguidas por la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellas (p ≤ 0,05). N = 4.
Fuente: autores

respectivamente), en relación con el control (tabla 7.3). El vaneamiento puede incrementarse por varios factores: altos niveles de N, baja radiación solar, muy baja o alta temperatura, vientos fuertes, salinidad en el suelo o estrés hídrico (Kumura, 1956; Yoshida & Parao, 1976; Yoshida, 1981), lo que puede ocasionar: 1) incremento en el número de granos; 2) incremento en el número de carióspsides infértiles; 3) alta susceptibilidad a vuelco, y 4) disminución en la acumulación de almidones en el estado de floración (Matsuo *et al.*, 1995). De estas variables, la única diferencia con respecto al control (que presentó unos valores de 19,5% de vaneamiento) fue la aplicación de enmiendas microbianas, las que pudieron incidir en mejor asimilación de nutrientes, particularmente N en algunos tratamientos como la cepa IBUN-C9, lo cual puede llevar a bajo almacenamiento de carbohidratos no estructurales en el grano en tiempo de floración, y así al incremento del vaneamiento (Kumura, 1956).

Con respecto al porcentaje de N, P y K foliar y los parámetros de calidad molinera, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Aun así, se hallaron incrementos hasta del 40 % en el porcentaje de P foliar para el aislamiento IBUN-13HSFC01 (tabla 7.4). Este aislamiento promovió incremento (no significativo) del 36 % en el peso seco de vástago y del 7 % en el rendimiento con respecto al control, indicando un efecto como promotor de crecimiento vegetal. En suelos de los Llanos Orientales, el P es un factor limitante para el crecimiento del arroz dado que este es atrapado por las altas concentraciones de Fe y Al (Cortés, 1982). Sin embargo, los MSF pueden liberar este P debido a la secreción de metabolitos, como algunos ácidos orgánicos e inorgánicos, la producción de agentes quelantes como 2-cetoglutarato, citrato, oxalato y lactato, mejorando la asimilación de dicho nutriente por parte de la planta (Rodríguez y Fraga, 1999). El aislamiento IBUN-10HCAFO3 mostró incrementos en el rendimiento del orden de 15 %, los cuales son consistentes con los valores de número de granos por panícula y porcentaje de vaneamiento relativamente bajo, o al menos similar a los valores reportados para el control (20,1 %).

Los rendimientos del cultivo fueron bajos con respecto a los registrados para la zona en el segundo semestre del año 2008, con valores promedio de 6,5 t ha⁻¹ de grano *paddy*. Esto sucedió a pesar de que el número de panículas m² y números de granos fueron aceptables para la región. Esta situación podría obedecer al alto porcentaje de vaneamiento, así como a los altos períodos de lluvia y alta nubosidad registrados a lo largo del cultivo, ya que la presencia de otros factores como incidencia y severidad de agentes patógenos fue monitoreada y no registró daños significativos. De acuerdo con lo anterior y con los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda hacer una repetición en el tiempo de este experimento que incluya controles de fertilización de diferentes dosis de N y se disminuyan las concentraciones de P

Tabla 7.4 Análisis foliar (% N, % P y % K) y peso seco de vástago (PSV) de plantas de arroz Fedearroz 174 en estado de máximo embuchamiento (70 DDE).

Tratamiento	% N	% P	% K	PSV (g/m ²)
IBUN-C9N	2,02 ^x ± 0,09 ^y a ^z	0,22 ± 0,01 a	1,60 ± 0,10 a	468,82 ± 80,18 a
IBUN-C5/C6/C7	2,05 ± 0,02 a	0,22 ± 0,01 a	1,62 ± 0,08 a	506,16 ± 103,29 a
<i>A. chroococcum</i> y <i>Azospirillum</i> sp.	2,02 ± 0,06 a	0,21 ± 0,01 a	1,66 ± 0,04 a	571,75 ± 108,46 a
IBUN-13HSFC01	2,07 ± 0,06 a	0,28 ± 0,04 a	1,53 ± 0,05 a	609,33 ± 49,76 a
IBUN-10HCAF03	2,09 ± 0,12 a	0,22 ± 0,01 a	1,56 ± 0,03 a	427,88 ± 13,59 a
<i>P. janthinellum</i>	1,98 ± 0,05 a	0,20 ± 0,01 a	1,60 ± 0,06 a	520,31 ± 62,44 a
Micorriza	2,04 ± 0,08 a	0,22 ± 0,01 a	1,63 ± 0,11 a	482,50 ± 11,41 a
Control	2,04 ± 0,05 a	0,20 ± 0,01 a	1,50 ± 0,04 a	448,04 ± 29,14 a

¹Promedio.
²Error estándar.
^zMedias de la misma columna seguidas por la misma letra no muestran diferencias significativas entre ellas (p ≤ 0,05). N = 4.
Fuente: autores

para los MSF y la micorriza ya que este elemento limita la actividad de dichos grupos funcionales (Rodríguez y Fraga, 1999).

El desarrollo de un inoculante bacteriano requiere gran trabajo de investigación y ensayos que aseguren la consistencia de los resultados (capítulo 8). En este sentido, para potenciar la actividad de un inoculante bacteriano es necesario evaluar todos los factores asociados a la promoción de crecimiento; estos factores incluyen: la selección de genotipos de arroz mejor adaptados a la interacción con microorganismos promotores de crecimiento (Gyaneshwar *et al.*, 2002), la concentración más adecuada del inóculo (Dobbelaere *et al.*, 2002), los mecanismos de promoción de los microorganismos PCV (Dutta y Podile, 2010), la adaptabilidad del inóculo a las condiciones físicas y químicas de los suelos donde dicho inóculo va a ser evaluado, prototipos de formulación adecuados y la capacidad de competencia ante poblaciones nativas del suelo (Lucy *et al.*, 2004). En este contexto, el desarrollo de una estrategia de fertilización que incluya el empleo de enmiendas microbianas es una tarea que exige la sincronización de varias disciplinas para que brinde los frutos esperados en términos de rendimiento y productividad. Por tal motivo, es importante seguir realizando estudios de evaluación y validación de prácticas y productos a nivel de campo, que conduzcan a la optimización de este tipo de manejo integrado de la fertilización en las diferentes zonas arroceras del país.

Conclusiones

Los resultados de este estudio permiten concluir que:

1. En relación con el ensayo de Tolima, la aplicación de una enmienda microbiana con microorganismos celulolíticos, conducente a la

degradación del tamo para mejorar la incorporación de nutrientes en el cultivo de soca, permitió incrementos significativos en el rendimiento (superiores al 21 %), indicando que esta es una práctica importante tanto para cultivos de soca como para cultivos convencionales, la cual no acarrea riesgos fitosanitarios, al menos para la permanencia de agentes fúngicos de cosechas anteriores, ya que las formulaciones del hongo *Trichoderma spp.* son vendidas comercialmente para el control de las enfermedades fúngicas del arroz.

2. En lo relativo al ensayo de Meta, los resultados de este trabajo sugieren que los tratamientos donde se aplicaron los microorganismos (particularmente el tratamiento con micorrizas), tuvo un efecto sobre el vaneamiento en el arroz. Algunos autores expresan que podría existir una relación entre desbalances nutricionales y el vaneamiento. Dado que el tratamiento con microorganismos está diseñado entre otras cosas para mejorar la nutrición vegetal, es relevante realizar estudios que permitan determinar el efecto del uso de microorganismos en esta enfermedad, con el objeto de mejorar las dosis de fertilizantes y microorganismos para lograr resultados óptimos.
3. En futuros ensayos es importante modificar las dosis de fertilizantes, tanto de N como de P, puesto que la optimización de este tipo de enmiendas (como la aplicación de micorrizas, bacterias PCV o MSF) puede depender de la existencia de condiciones limitantes de nutrientes.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo manifiestan su agradecimiento a los ingenieros Carlos Caicedo por la consecución y manejo del terreno de Saldaña, Ricardo Perafán, Óscar Cardozo y Gabriel Garcés, por su colaboración en el procesamiento de los datos de molinería y rendimiento, la evaluación del estado fitosanitario y sus consejos para el manejo general del ensayo. A los agricultores Carlos Jiménez y Pedro Delgado, por su amable disposición en el préstamo de los terrenos donde se realizó la investigación. Así mismo manifiestan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, entidades que cofinanciaron este trabajo a través del contrato 2007B6423 161-1020/2007. Javier Vanegas agradece la financiación de “Apoyo a doctorados nacionales” del año 2007, de Colciencias-Icetex-SENA.

Referencias

- Arévalo, E. (2009). *Variedades Fedearroz: Clave de altos rendimientos en el Huila*. Correo: 221, 4.

- Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 719-739.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Bashan, Y., Holguín, G., & Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 521-577.
- Bronick, C. J., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124(1-2), 3-22.
- Çakmakç, R., Dönmez, F., Aydın, A., & Şahin, F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1482-1487.
- Choudhury, A., & Kennedy, I. R. (2004). Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biology and Fertility of Soils*, 39(4), 219-227.
- Cortés, L. A. (1982). *Geografía de los suelos de Colombia*. Bogotá: Universidad Jorge Tadeo Lozano. Colombiana de Impresos Ltda.
- Díaz-Zorita, M. & Fernández-Canigia, M. V. (2009). Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 3-11.
- Dobbelaere, S. *et al.* (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28(9), 871-879.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., & Vanderleyden, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36(4), 284-297.
- Doberman, A., & Fairhurst, T. (2000). *Arroz: Desórdenes nutricionales y manejo de nutrientes*. G.A., USA: International Plant Nutrition Institute. 228 pp.
- Dutta, S., & Podile, A. R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria (RPCV): the bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), 232-244.
- Espinal, C., Martínez, H. J., & Acevedo, X. (2005). La cadena de arroz en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. *Documento de Trabajo 52*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio de Agrociudades Colombia.
- Fages, J. (1994). *Azospirillum* inoculants and field experiments. In Y. Okon (Ed.). (pp. 87-110). *Azospirillum-plant associations*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press.
- Fedearroz. (2000). *Manejo y conservación de suelos para la producción de arroz en Colombia*. Bogotá: Fedearroz.

- Garcés, G. & Ospina, J. (Enero de 2009). *Estrategias para el aprovechamiento de los residuos de cosecha del arroz*. Bogotá, D.C. Fedearroz. Correo: 217, 4-5
- Gyaneshwar, P., James, E. K., Reddy, P. M., & Ladha, J. K. (2002). Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium tolerant rice varieties. *New Phytologist*, 154(1), 131-145.
- Kausar, H., Sariah, M., Mohd Saud, H., Zahangir Alam, M., & Razi Ismail, M. (2010). Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(7), 594-600.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., & Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1229-1244.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Kumura, A. (1956). Studies on the effect internal nitrogen concentration of rice plant on the constitutional factors of grain yield. *Proceedings of Crop Science Society of Japan*, 24(3), 177-180.
- Kurakov, A. V., Prokhorov, I. S., Kostina, N. V., Makhova, E. G., & Sadykova, V. S. (2006). Stimulation of nitrogen fixation in soddy-podzolic soils with fungi. *Eurasian Soil Science*. 39(9), 968-974.
- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R. (2004). *Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 1-25.
- Matsuo, T., Kumasawa, K., Ishii, R., Ishihara, H., & Hirata, H. (1995). *Science of Rice Plant*. (vol. 11). *Physiology*. Tokio: Food and Agriculture Policy Research Center.
- Microfertisa. (2005). *Guía técnica para el manejo nutricional de los cultivos*. Bogotá: Microfertisa.
- Minitab Inc. (1986). *Minitab: Data Analysis Software, release 5-1-3*. State College, PA: Minitab Inc.
- Mirchink, T. G. (1988). *Soil Mycology*. Moscow, Russia: University Press (original en ruso).
- Okon, Y., & Labandera-González, C. A. (1994). Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1591-1601.
- Omar, N., Berge, O., Shalaan, S. N., Hubert, J. L., Heulin, T., & Balandreau, J. (1992). Inoculation of rice with *Azospirillum brasilense* in Egypt. Results of five different trials between 1985 and 1990. *Symbiosis*, 13, 281-289.
- Pedraza, R., Bellone, C. H., Carrizo de Bellone, S., Fernandes Boa Sorte, P. M., & Santos Teixeira, K. R. (2009). Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic

- bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 36-43.
- Ponnamperuma F. N. (1984). Straw as source of nutrients for wetland rice. En: Research Institute (Ed). *Organic matter and rice. International Rice* (pp.117-130). Los Baños Philipinas: autores
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
- Royer, J. C., & Nakas, J. P. (1989). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microbial Technology*, 11(7), 405-410.
- Rudresh, D. L., Shivaprakash, M. K., & Prasad, R. D. (2005). Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 51(3), 217-222.
- Saldaña. (2010). Recuperado de: <http://saldana-tolima.gov.co/index.shtml>
- STATGRAPHICS PLUS version 5.1 for Windows program. (2001). *Graphic Software System*. Rockville, M.D., USA: Manugistics Inc.
- Tiwari, V. N., Lehri, L. K., & Pathak, A. N. (1989). Effect of inoculating crops with phospho-microbes. *Experimental. Agriculture*, 25(1), 47-50.
- Vallejo, M., Bonilla, C., & Castilla, L. (2008). Evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno –líneas interespecíficas de arroz– nitrógeno, en *Typic haplustalfHapl*. *Acta Agronómica*, 57(1), 43-49.
- Vargas-García, M., Suárez-Estrella, F., López, M., & Moreno, J. (2010). Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management*, 30(5), 771-778.
- Wilson, C., Slaton, N., Norman, R., & Miller, D. (1998). *Efficient Use of fertilizer* (pp. 51-72). Rice Production Hand Book. Little Rock. Arkansas, USA: University of Arkansas, Division of Agriculture, Cooperative Extension Service.
- Yoshida, S. (1981). *Fundamentals of rice crop science*. Los Baños, Laguna, Philippines: The International Rice Research Institute.
- Yoshida, S., & Parao, F. T. (1976). Climatic influence on yield and yield components of lowland rice in the tropics. In International Rice Research Institute (Ed.). *Climate and rice* (pp. 471-494). Los Baños, Philippines: IRRI.

Bioprospección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal para su aplicación en el cultivo de arroz

Javier Vanegas Vargas*¹, Nathalia Flórez-Zapata**¹, Daniel Uribe-Vélez**¹

¹ Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.

- Estos autores contribuyeron de forma similar en la elaboración del artículo.

** duribev@unal.edu.co

El cultivo del arroz representa una serie de complejos biotipos artificiales, los cuales forman unos nichos microbianos únicos, producto de la interacción entre la química, la física y la biología de los suelos de arroz (Prassana *et al.*, 2010). Esta confluencia de nichos permite que se desarrolle una gran diversidad de microorganismos influidos principalmente por la zonación físico-química dada por la inundación o el anegamiento de los suelos (Liesack *et al.*, 2000). Dicha compartimentalización genera un ambiente particular caracterizado por su gran potencial redox, propiedades físicas, estatus nutricional y de luz que posibilitan la actividad de toda clase de microorganismos aerobios, anaerobios, microaerofílicos, heterótrofos, fotótrofos, de vida libre y simbióticos (Choudhury y Kennedy, 2004; Roger y Watanabe, 1986). En tal diversidad microbiana se favorece la actividad de grupos funcionales como las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofos (Piao *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 1995) y los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) (Datta *et al.*, 1982; Kundu y Gaur, 1984).

Entre estos grupos funcionales, cabe destacar los diazótrofos, los cuales pueden llegar a contribuir entre 15 y 50 kg de N por cultivo en lugares donde no se llevan a cabo prácticas de fertilización nitrogenada intensiva (Roger y Watanabe, 1986; Choudhury y Kennedy, 2004). Así mismo, considerando que un amplio rango de procesos que afectan las transformaciones del P en el suelo involucran microorganismos, y que estos hacen parte integral del metabolismo edáfico de este elemento (Chen *et al.*, 2006), se ha probado con resultados satisfactorios la utilización de enmiendas microbianas en cultivos de arroz a base de microorganismos que liberen P a partir de fuentes

tanto orgánicas (mineralizadores), como inorgánicas (solubilizadores) (Datta *et al.*, 1982; Kundu y Gaur, 1984; Trivedi *et al.*, 2007; Echeverri y Castilla, 2008). Las experiencias arriba mencionadas han conducido al desarrollo de inoculantes microbianos tanto en el contexto nacional (Castilla, 2006; Moreno-Sarmiento *et al.*, 2007) como internacional (Kundu y Gaur, 1984; Okon y Labandera-González, 1994; Trivedi *et al.*, 2007), contribuyendo a mejorar la disponibilidad y toma de nutrientes para la planta, al punto de ser reconocidos como microorganismos promotores de crecimiento vegetal, los cuales cada vez tienen mayor acogida en el momento de realizar el diseño de protocolos de fertilización.

Para el desarrollo de un biofertilizante es importante garantizar su efectividad para la promoción de crecimiento vegetal, bajo condiciones de campo. Esto implica un proceso minucioso de bioprospección que comprende una serie de pasos que van desde el aislamiento y la selección de microorganismos con potencial biofertilizante, hasta la apertura de nichos comerciales, pasando por el desarrollo de procesos de escalamiento y prototipos de formulación a nivel de planta piloto (figura 8.1). Para ello, es necesario involucrar especialistas tanto del sector investigativo como comercial, que aseguren el éxito del futuro inoculante. Este capítulo presenta los lineamientos generales para el desarrollo de un inoculante microbiano en arroz, haciendo énfasis en los procesos relacionados con el aislamiento y la caracterización de microorganismos de los grupos funcionales asociados al metabolismo del P y la fijación biológica de Nitrógeno (FBN). Cabe señalar que, por considerarlo fuera del foco de esta revisión, se han dejado a un lado todos los elementos legales asociados al acceso de recursos genéticos de los microorganismos que entrarían a ser parte del principio activo de un biofertilizante comercial. Sin embargo, los autores de esta investigación consideran que este es un tema muy importante que debe ser tenido en cuenta antes de iniciar cualquier proceso de bioprospección en nuestro país. Para un análisis comprensible de este tema, recomiendan la lectura de revisiones recientes en relación con este tema (Chaparro-Giraldo, 2009; Melgarejo, 2003).

Aislamiento de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR)

Microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fosfato

Los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) y mineralizadores de fosfato (MMF) han sido aislados tanto de suelo rizosférico (Liu *et al.*, 2011; Singh y Reddy, 2011; Reyes *et al.*, 2007) como no rizosférico (Chen *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2007), a través de la utilización de medios de cultivo que contienen como única fuente de crecimiento fosfatos insolubles, de tal forma que para que el microorganismo sea capaz de crecer y desarrollarse deberá solubilizar el fosfato insoluble del medio. La tabla 8.1 presenta la

Bioprospección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal Para su aplicación en el cultivo de arroz

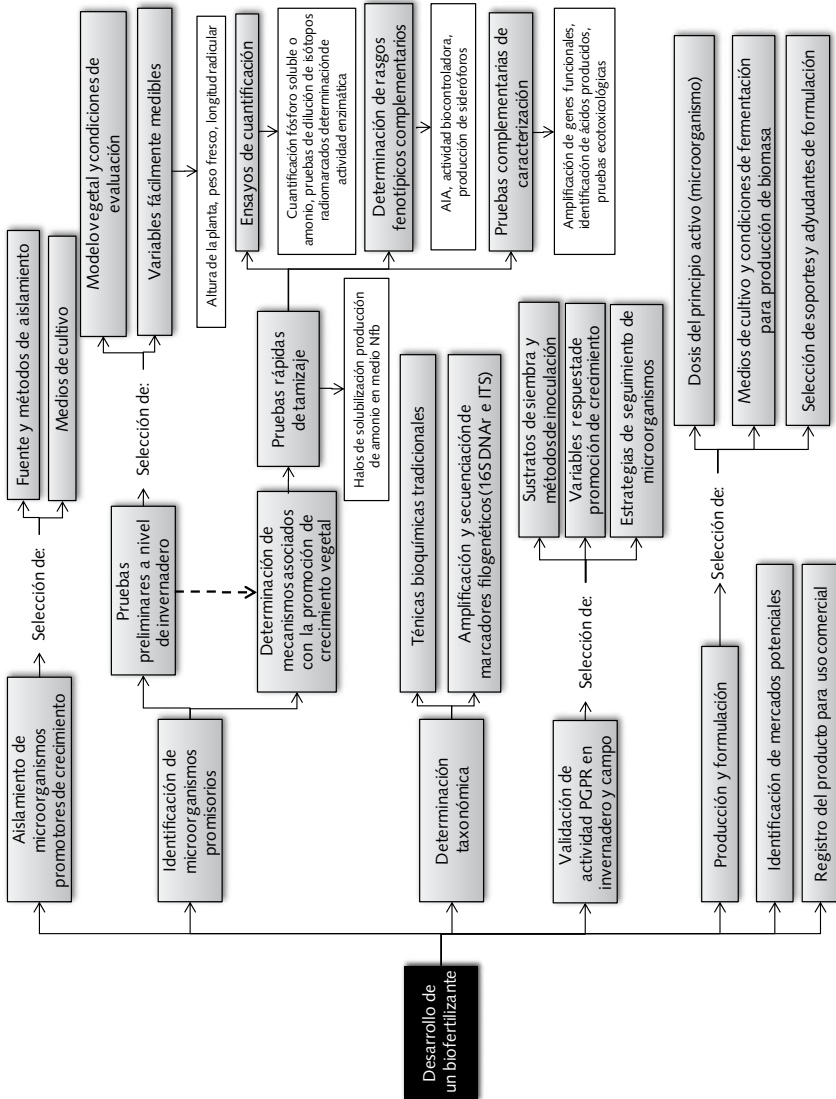


Figura 8.1 Pasos para el desarrollo comercial de un bioinoculante con miras a su aplicación en un cultivo de interés.

Fuente: autores

composición de los principales medios de cultivo que han sido utilizados para el aislamiento y estudio de este grupo de microorganismos.

Tabla 8.1 Medios de cultivo utilizados para la selección de microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fósforo.	
Medio de cultivo	Composición por litro
Medios de cultivo para solubilizadores de P	
National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium (NBRIP)	Glucosa 10 g; Ca ₃ (PO ₄) ₂ 5 g; MgCl ₂ ·6H ₂ O 5 g; MgSO ₄ ·H ₂ O 0,25 g; KCl 0,2 g; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 g (Nautiyal, 1999)
Pikovskaya (PVK).	Glucosa 10 g; Ca ₃ (PO ₄) ₂ 5 g; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g; NaCl 0,2 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,1 g; KCl 0,2 g; extracto de levadura 0,5 g; MnSO ₄ ·H ₂ O 0,002 g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,002 g (Pikovskaya, 1948)
SRS	Glucosa 10 g; Ca ₃ (PO ₄) ₂ 5 g; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g; NaCl 0,2 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,3 g; KCl 0,2 g; extracto de levadura 0,5 g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,004 g; púrpura de bromocresol 0,1 g (Sundara-Rao & Sinha, 1963)
Medio para solubilizadores	NaCl 0,1 g; NH ₄ Cl 1,0 g; KCl 0,2 g; CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,1 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1,2 g; glucosa 10,0 g; extracto de levadura 0,5 g; FePO ₄ o AlPO ₄ 2 g (Nahas <i>et al.</i> , 1994)
Medio mínimo sintético (SMM)	Glucosa 10 g; NaNO ₃ 2 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5 g; KCl 0,5 g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,01 g; roca fosfórica 2,2 mM. (Hamdali <i>et al.</i> , 2008a)
Medios de cultivo para mineralizadores de P	
Medio yema de huevo (Yolk Medium-YM)	Peptona 10,0 g; NaCl 5,0 g; extracto de carne 10,0 g; yema de huevo fresca 1 unidad (Zhao <i>et al.</i> , 2001)
Medio lecitina (LM)	Glucosa 10,0 g; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g; NaCl 0,3 g; KCl 0,3 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,3 g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,03 g; MnSO ₄ ·4H ₂ O 0,03 g; lecitina 0,2 g; CaCO ₃ 1,0 g; extracto de levadura 0,5 g (Tao <i>et al.</i> , 2008).
Medio fitato de calcio	Fitato de calcio 2 g; NH ₄ NO ₃ 5 g; KCl 0,5 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5 g; MnSO ₄ ·4H ₂ O 0,3 g %; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,3 g (pH 5,7) (Howson y Davis, 1983).
Fuente: autores	

La fuente de P insoluble utilizada en los medios de cultivo, relacionados en la tabla 8.1, y quizás la más utilizada para la selección de MSF es el fosfato tricálcico (Chen *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2007; Rahi, *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2008); sin embargo, otras fuentes como hidroxipatita (Barroso y Nahas, 2005; Kim *et al.*, 1998), roca fosfórica (Singh y Reddy, 2011; Toro *et al.*, 1997), fosfato de hierro (Barroso y Nahas, 2005; Ogbo, 2010; Pérez *et al.*, 2007) y fosfato de aluminio (Barroso y Nahas, 2005; Pérez *et al.*, 2007), han sido utilizadas exitosamente para el aislamiento de MSF, mientras que para los MMF se han usado la yema de huevo (Tao *et al.*, 2008;

Zhao *et al.*, 2001), la lecitina (Hu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2008) y el fitato de calcio (Hariprasad *et al.*, 2009) como fuentes de fosfato orgánico.

El principal mecanismo que poseen los microorganismos para la solubilización de fosfato es la excreción de protones o la liberación de ácidos orgánicos. Estos productos tienen efecto en la disminución en los niveles de pH, y, en el caso de los ácidos orgánicos, los grupos hidroxilo y carboxilo quelan los cationes unidos al fosfato, favoreciendo la desestabilización del complejo formado entre el P y los cationes que lo atrapan, dejando así el P soluble disponible para la planta (Kpombrekou y Tabatabai, 1994; Rodríguez y Fraga, 1999). La producción de halos claros alrededor de las colonias (debido a la producción de estos ácidos y a la solubilización de fosfato) es el principal rasgo fenotípico utilizado para la selección de MSF (de Freitas *et al.*, 1997; Nautiyal, 1999). No obstante, algunos microorganismos que no forman halos de solubilización sí pueden solubilizar diferentes fosfatos en un medio de cultivo líquido (Gupta *et al.*, 1994; Nautiyal, 1999), por lo que se recomienda la incorporación de un indicador de pH (e.g. azul de bromofenol) al medio de cultivo sólido, para evidenciar más claramente la formación del halo, así como la producción de ácidos (halos de acidificación), los cuales, como ya se mencionó, podrían ser responsables del fenómeno de solubilización (Gupta *et al.*, 1994; Mehta y Nautiyal, 2001). Por otro lado, la capacidad solubilizadora de fosfato en el medio de cultivo depende del tiempo de incubación, el pH del medio de cultivo, la naturaleza de la fuente de fosfato y la naturaleza y concentración de las fuentes de C y N incorporadas al medio. Estos factores determinarán el desarrollo y crecimiento óptimo del microorganismo y, por tanto, su capacidad solubilizadora.

Posterior a la selección del medio de cultivo apropiado, se pueden utilizar diferentes técnicas para el aislamiento de MSF. El recuento de células viables por extensión en placa es quizás el más utilizado ya que permite aislarlos y purificarlos, con lo cual se pueden determinar los fenotipos de estos en forma individual, y además permite amplificar la señal (fenotipo) que ha de ser observada (Atlas y Bartha, 1993). En esta técnica, se hacen diluciones seriadas en base diez de la muestra y posteriormente se realiza la siembra de las mismas sobre la superficie del medio de cultivo (Clark, 1965). En algunos casos, se realiza un paso previo de enriquecimiento de los MSF, en el cual la muestra ambiental es inoculada a un medio de cultivo líquido con una fuente insoluble de fosfato que permite seleccionar y enriquecer a los microorganismos de interés; transcurrido el tiempo de incubación, los microorganismos pueden ser aislados realizando diluciones seriadas del enriquecimiento y siembra en placa (Atlas y Bartha, 1993; Pal, 1998). Por otro lado, para el aislamiento de hongos solubilizadores de P, se usa la siembra de partículas de suelo sobre la superficie del medio de cultivo previamente preparado con fuentes de fósforo insoluble. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, en el que se

evidencia la formación de micelio acompañada de zonas de clarificación en el medio, se puede llevar a cabo el aislamiento de hongos con capacidad solubilizadora de P (Vera *et al.*, 2002).

Durante la etapa de selección, aislamiento y caracterización de MSF o MMF, es importante garantizar que el material de laboratorio no tenga trazas de fosfatos, ya que esto disminuiría la presión de selección del medio de cultivo y permitiría el desarrollo de microorganismos que no tienen la capacidad de utilizar las fuentes insolubles de fosfato, o bien que aquellos que tienen la característica no demuestren dicho rasgo fenotípico, dado que tienen una fuente de fosfato disponible para su crecimiento y desarrollo. El fosfato adherido al material de laboratorio se elimina sumergiéndolo en HCl al 2 % durante 12 horas, seguido de tres lavados con agua destilada desionizada; además, el material debe ser manipulado con guantes de látex para prevenir contaminación con fosfatos presentes en la piel (Lara, 2007).

Aislamiento de diazótrofos

Como se mencionó para los MSF, es preciso seleccionar el medio de cultivo, la metodología de aislamiento y el hábitat de interés (rizósfera, rizoplasma y endófitos). Los medios de cultivo para la selección de diazótrofos son medios libres de nitrógeno (Nfb), que en ciertos casos han sido modificados para favorecer la selección de microorganismos de interés o mejor adaptados al suelo de donde son aislados, a través de cambios en las fuentes de C (Bashan *et al.*, 1993), las concentraciones de NaCl (Holguín *et al.*, 1992) y pH (Baldani *et al.*, 2000). Por ejemplo, el ácido málico se usa como fuente de C para favorecer el aislamiento de *Azospirillum*, y la sacarosa para endófitos de caña de azúcar (Bashan *et al.*, 1993). Para el aislamiento de diazótrofos aerobios como *Azotobacter sp.*, se emplean medios Nfb con manitol como fuente de C (Park *et al.*, 2005). El uso de medios de cultivo con fuentes de C combinado (Rennie, 1981) permite recuperar un mayor número de diazótrofos en cultivos de arroz. Este medio ha sido modificado al agregar extractos vegetales de arroz para aislamientos de diazótrofos endófitos (Elbeltagy *et al.*, 2001). Sin embargo, este medio de Rennie (1981) favorece la selección de *Enterobacteriaceae* que han sido reportadas como PGPR de arroz como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Serratia* y *Pantoea* (Barraquío *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2004; Mehnaz *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2001), las cuales desempeñan un rol relevante en la rizósfera de plantas de arroz (Ladha y Reddy, 1995).

Con respecto a las metodologías de aislamiento, se han empleado las series de dilución con siembra en medios Nfb, medios de enriquecimiento en Nfb semisólidos (Döbereiner *et al.*, 1995), el método de la espermosfera (Bashan *et al.*, 1993) y la incubación de mezcla de azúcares con suelo (Aquilanti *et al.*, 2004). Para el aislamiento de bacterias microaerófilas como

Azospirillum sp. y *Herbaspirillum sp.* se utilizan enriquecimientos en medios NFB, JMV y LGI, luego de la evaluación de la actividad nitrogenasa (Döbereiner *et al.*, 1995).

Tabla 8.2 Medios de cultivo para la selección de bacterias fijadoras de nitrógeno.	
Medio y diazótrofo	Composición del Medio (L)
Medio LG: <i>Azotobacter spp.</i> y <i>Azomonas spp.</i>	Sacarosa 20 g; K ₂ HPO ₄ 0,05 g; KH ₂ PO ₄ 0,15 g; CaCl ₂ 0,01 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 2 mg; FeCl ₂ 0,01 g; azul de bromotimol 2 mL (solución al 0,5% en etanol); CaCO ₃ 1g; Agar 15 g (Döbereiner <i>et al.</i> , 1995)*.
Medio ASHBI: <i>Azotobacter spp.</i>	Manitol 20 g ó sacarosa 40,0 g; K ₂ HPO ₄ 0,2 g; Mg SO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g; NaCl 0,2 g; K ₂ SO ₄ 0,1 g; Ca CO ₃ 5,0 g; Agar 15,0 g; ajustar a pH 7 (Aquilanti <i>et al.</i> , 2004).
Medio Nfb-Az: <i>Azospirillum spp.</i>	Ácido málico 5 g/L; K ₂ HPO ₄ 0,5 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g; NaCl 0,1 g; CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,02 g; solución de elementos menores 2 mL (preparación en g.L ⁻¹ : CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,4 g; ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0,12 g; H ₂ BO ₄ 1,4 g; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 1 g; MnSO ₄ ·H ₂ O 1,5 g); azul de bromotimol 2 mL (solución al 0,5% en 0,2 M KOH); solución Fe EDTA 1,64%; solución de vitaminas 1 mL (preparación en 100 mL: biotina 10 mg; Piridoxol-HCl 20 mg); Agar 1,75 g; ajustar a pH 6,8 con KOH (Döbereiner <i>et al.</i> , 1995)*
Medio semisólido LGI: <i>A. amazonese</i>	Sacarosa 5g; K ₂ HPO ₄ 0,5 g; KH ₂ PO ₄ 0,6 g; CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,002 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0,002 g; FeCl ₃ 0,01g; azul de bromotimol (solución al 0,5% en 0,2 M KOH); Agar 1,8 g; ajustar a pH 6 (Döbereiner <i>et al.</i> , 1995)*
Medio Nfb-C: Diferentes diazó- trofos aerobios	Manitol 5 g; ácido málico 5 g; lactato de sodio 0,5 mL (60 % v/v); K ₂ HPO ₄ 0,8 g; KH ₂ PO ₄ 0,2 g; Mg SO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g; CaCl ₂ 0,06 g; NaCl 0,1 g; extracto de levadura 0,001g; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0,0025g; Na ₂ Fe EDTA 0,0028 g; Biotina 5µg; PABA (ácido p-aminobenzoico) 10 µg; Ca ₂ HPO ₄ 5,0 g; Agar 18,0 g; azul de bromotimol 2 ml (solución al 0,5 % con KOH al 0,2 M); ajustar a pH 7. Para preparar el agar semisólido, se reduce el agar a la décima parte y se sirve el medio de cultivo en frascos (1/3 del volumen), antes de esterilizar (Rennie, 1981)
Medio semisólido JNFB: <i>Herbaspirillum spp.</i> <i>Azoarcus spp.</i>	Ácido málico 5 g; K ₂ HPO ₄ 1,5 g; Mg SO ₄ ·7H ₂ O 0,2 g; NaCl 0,1 g; CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,2g; solución de elementos menores (como en Nfb-Az); solución de vitaminas (como en Nfb-Az); solución Fe-EDTA 1,64 %; azul de bromotimol 2 ml (solución al 0,5% con KOH al 0,2 M); Agar 2 g; ajustar a pH 6 (Döbereiner <i>et al.</i> , 1995)*
*Los reactivos deben ser adicionados en la secuencia mencionada para evitar reacciones indeseadas. Fuente: autores	

El uso de bacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal (PCV) con potencial de comercialización está limitado a un reducido número de especies microbianas que comprenden diazótrofos de ambientes rizosférico como *Azospirillum*, *Azotobacter*, y especies endófitas como *Herbaspirillum sp*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia sp.* y *Azoarcus sp.*, las cuales han sido documentadas como promotoras de crecimiento en arroz (Kennedy *et al.*, 2004).

Identificación de microorganismos promisorios

Las cepas con potencial actividad biofertilizante deben promover el crecimiento vegetal, así como ser abundante en el suelo, tener una rápida tasa de crecimiento, no generar enfermedad en las raíces y poseer alta capacidad de colonización en la rizósfera (Kennedy *et al.*, 2004). La colonización, competencia y persistencia son factores cruciales para la promoción de crecimiento vegetal (Barea *et al.*, 2005), que pocas veces son evaluados como mecanismos de promoción. La mayoría de trabajos de selección de microorganismos con potencial biofertilizante se han enfocado en caracterizar los mecanismos de promoción de crecimiento de los aislamientos obtenidos. Sin embargo, las pruebas más importantes de una PCV son los ensayos de campo e invernadero. Por esta razón, algunos autores han propuesto que los ensayos de invernadero sean un método de selección de PCV y no los mecanismos de promoción (Klopper *et al.*, 1988).

Pruebas preliminares bajo condiciones de invernadero como sistema de selección de cepas promisorias

Los ensayos preliminares en condiciones de invernadero para la selección de cepas promisorias son conducidos bajo la hipótesis de que aquellos microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal, evidenciado a través de variables fácilmente medibles como altura de la planta, peso fresco o longitud radicular, son microorganismos capaces de colonizar la rizósfera, el rizoplano o los tejidos internos de la planta, de manera que al establecer una relación con esta, expresan algún o algunos rasgos fenotípicos que promueven su crecimiento. Esta aproximación implica el desarrollo de pruebas de invernadero rápidas, en las cuales se recomienda iniciar el tamizaje con un gran número de cepas, donde solo aquellas que resulten promisorias serán posteriormente caracterizadas (por ejemplo, determinación taxonómica e identificación de rasgos fenotípicos asociados a la actividad de promoción de crecimiento vegetal). En este esquema de selección, es importante la repetición de los ensayos, con el objeto de seleccionar las PCV que presenten mayor consistencia en el tiempo (Klopper *et al.*, 1988). Por otra parte, es esencial garantizar que estos ensayos se realicen en suelos no esterilizados para poder evaluar la capacidad de competencia ante la microflora nativa y colonización de la rizósfera (Cattelan *et al.*, 1999).

Independientemente de la ruta que se escoja como sistema de tamizaje de aislamientos promisorios (selección por pruebas de invernadero o por determinación de rasgos fenotípicos asociados a la promoción de crecimiento vegetal), el proceso de selección siempre debe terminar en la elaboración de pruebas de invernadero y campo que validen el sistema de selección de aislamientos promisorios (figura 8.1).

Selección dirigida por mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

Microorganismos solubilizadores de fosfato

Determinación de rasgos fenotípicos de la capacidad solubilizadora o mineralizadora de fosfato

La forma más sencilla de evaluar cuantitativamente la capacidad solubilizadora de fosfato es a través de la medición de los halos de solubilización producidos en los medios con fosfato insoluble (fosfato de calcio, fosfato de aluminio o fosfato de hierro), los cuales se obtienen calculando la diferencia entre el diámetro total y el diámetro de la colonia (Nautiyal, 1999). Posteriormente, se puede estimar el índice de solubilización de fosfato, como resultado de la relación diámetro del halo de solubilización/diámetro de la colonia (Liu *et al.*, 2011). Esta determinación puede realizarse colocando un volumen pequeño (5-10 μ l) de la suspensión del microorganismo por evaluar a una concentración conocida sobre la superficie del medio de cultivo.

La estimación de la capacidad solubilizadora o mineralizadora de fosfato de un microorganismo puede ser más precisa al cuantificar la cantidad de P liberado en un medio de cultivo líquido, que contiene la fuente de fosfato insoluble (mineral u orgánica), en relación con el P soluble presente en un medio control no inoculado. Para este procedimiento, se utilizan caldos de cultivo como el NBRIP (tabla 8.1), suplementados con la fuente de P insoluble, en el que concentraciones conocidas del inóculo microbiano (por ejemplo, suspensiones bacterianas, trozos de micelio, suspensiones de conidias) son sembradas e incubadas entre 3 y 15 días en agitación constante (120 a 150 rpm), a una temperatura óptima para el microorganismo entre 28 °C y 30 °C, comúnmente (Behbahani, 2010; Rahi *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2008). Transcurrido el tiempo de incubación, se puede determinar la concentración de P soluble presente en el sobrenadante del medio de cultivo a través de diferentes métodos colorimétricos, tales como el de cloruro de estaño (Jackson, 1973), el de molibdato-ascorbato (Ames, 1966) y el de vanadomolibdofosfórico (Koenig y Johnson, 1942).

Generalmente, la determinación del P soluble en el medio de cultivo se acompaña de la valoración potenciométrica del pH, ya que el principal mecanismo asociado al fenómeno de solubilización es la producción de ácidos orgánicos. Se espera un descenso del pH en el medio de cultivo, e incluso se ha propuesto la incorporación de amortiguadores de pH (tampones) al medio de cultivo como una estrategia de aislamiento de microorganismos más eficientes, dado que estas son condiciones más astringentes para que el microorganismo lleve a cabo la solubilización (Gyaneshwar *et al.*, 1998).

El estudio de los mecanismos de solubilización de fosfato ha sido principalmente conducido mediante la determinación y concentración de ácidos orgánicos producidos por los MSF a través de técnicas como la cromatografía en capa fina (Pérez *et al.*, 2007) y cromatografía líquida de alta

eficiencia (HPLC). Esta última técnica permite separar e identificar un compuesto químico de interés en una muestra, gracias a que a medida que este atraviesa la columna cromatográfica, establece diferentes interacciones físicas y químicas entre esta y los compuestos analizados, de manera que el tiempo que gasta el compuesto en ser eluido (tiempo de retención) es característico e identificativo. Esta técnica posibilita identificar la producción de ácidos orgánicos como el láctico, acético, propiónico, pirúvico, malónico, maleico, tartárico, oxálico, succínico, fumárico, cítrico, fórmico, glucónico, galacturónico, glucorónico, glicólico, cetoglucónico, entre otros, en el sobrenadante del medio de cultivo de MSF y MMF (Chen *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2011; Singh y Reddy, 2011). El ácido glucónico es el principal ácido orgánico para un número considerable de MSF, como *Pseudomonas sp.*, *B. cepacia* y *Erwinia herbicola* (Rodríguez y Fraga, 1999).

Por otro lado, para los MMF, la cuantificación de la actividad de enzimas como las fosfatasas, que están involucradas en los procesos de mineralización (Rodríguez y Fraga, 1999) también puede ser utilizada como una forma para estimar la actividad del microorganismo (de Freitas *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2011). Para dicha medición, se emplea como sustrato el ρ -nitrofenil fosfato, que es hidrolizado, liberando ρ -nitrofenol, el cual es cuantificado espectrofotométricamente (Tabatabai y Bremner, 1969).

Determinación de rasgos genotípicos de la capacidad solubilizadora o mineralizadora de fosfato

Un aspecto adicional que se ha abordado para el estudio de los mecanismos asociados al fenómeno de solubilización y mineralización es el estudio de los genes responsables de dicho fenotipo. Cabe resaltar que el conocimiento de dichos genes es aún escaso; sin embargo, ha sido posible aislar y caracterizar genes asociados a la mineralización de P, tales como los que codifican para fosfatasas ácidas no específicas (*napD*, *napE*, *phoC*, *napA*) o fitasas (*phyA*), así como aquellos asociados con la capacidad solubilizadora, como los relacionados con la producción de ácido glucónico (genes que codifican para la síntesis de la enzima glucosa dehidrogenasa (GDH) y su cofactor la pirroloquinolina quinona sintasa (PQQ), que han facilitado la manipulación genética de algunos microorganismos para aumentar su capacidad solubilizadora o mineralizadora de fosfato (Rodríguez *et al.*, 2006). Por otro lado, el conocimiento de la genética asociada al fenotipo de solubilización de fosfato ha permitido utilizar la presencia de genes como el *gdh* y *pqqE* para el tamizaje de MSF a través de su amplificación por la técnica de PCR (Pérez *et al.*, 2007).

Microorganismos fijadores biológicos de nitrógeno

Determinación de rasgos fenotípicos de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno

El potencial de los diazótrofos se puede determinar mediante ensayos de reducción del acetileno, la producción de amonio en medios NFB y el empleo de técnicas isotópicas. El ensayo de reducción del acetileno (ARA) ha sido ampliamente usado para evaluar indirectamente la fijación de N mediante la actividad de la enzima nitrogenasa, dado que esta enzima es inespecífica, y así como puede convertir el N molecular en amonio, puede tomar el acetileno y convertirlo en etileno (Hardy *et al.*, 1968). Por tanto, en esta técnica se determina por cromatografía de gases el etileno producido por una muestra incubada en una atmósfera. Cabe señalar que la técnica de ARA presenta una alta sensibilidad, es ampliamente empleada, y económica frente a otras técnicas como las isotópicas (Zehr y Montoya, 2007). Otra técnica indirecta para evaluar la capacidad de fijar N es cuantificar la concentración de amonio en un medio de crecimiento como los NFB (Christiansen-Weniger y Van Veen, 1991) o agua peptonada (Ahmad *et al.*, 2008) ya que es muy sencilla y no requiere instrumentos sofisticados como el cromatógrafo.

Las técnicas isotópicas de ^{15}N se consideran como las más confiables para suministrar valores cuantitativos e integrados del N_2 fijado, ya que esta técnica distingue la proporción de N en la planta que procede del suelo, un fertilizante y la atmósfera (Barea, 1991). Esta metodología se fundamenta en que las plantas inoculadas se desarrollan en un suelo que posee una proporción de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ diferente de aquella casi constante proporción de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de 0,3663 % presente en el N_2 de la atmósfera. Así, la incorporación de N proveniente de la FBN conducirá a una proporción diferente de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en el tejido de la planta respecto a otra planta que no haya sido inoculada con microorganismos FBN o incluso del suelo en donde crece la planta (Barea *et al.*, 1991). De esta forma, el método de la dilución isotópica consiste en adicionar al suelo una fuente de N orgánico o inorgánico enriquecida con ^{15}N , para incrementar artificialmente la proporción de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ del N disponible del suelo (Barea *et al.*, 1991). Aunque este método es aceptado como el más confiable, hay relativamente pocos reportes en los cuales se emplea, debido a los altos costos del isótopo y los equipos para su detección (Campillo *et al.*, 2002).

Determinación de rasgos genotípicos de la capacidad de FBN

Algunos autores (Bürgman *et al.*, 2004; Demba-Diallo *et al.*, 2008) han diseñado *primers* específicos para la amplificación de los genes asociados a la FBN, especialmente el gen de la nitrogenasa (*nifH*), que codifica para la hierro-proteína, también conocida como dinitrogenasa reductasa, una de las dos proteínas que conforman el complejo enzimático nitrogenasa, permitiendo de esta forma confirmar por esta ruta la presencia de los genes

responsables de dicho fenotipo. Sin embargo, cabe mencionar que la presencia de los genes no asegura que un microorganismo particular presenta actividad de FBN, ya que dichos genes o la ruta en general pueden estar inactivos funcionalmente.

Determinación de otros rasgos fenotípicos
para la búsqueda de microorganismos más eficientes

El proceso de caracterización de microorganismos con potencial para el desarrollo de inoculantes microbianos generalmente se acompaña de la descripción de otros rasgos fenotípicos de interés, tales como la producción de ácido indolacético (Rahi *et al.*, 2010), la producción de sideróforos (Hariprasad *et al.*, 2009; Rahi *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2006), la actividad biocontroladora frente a un patógeno del cultivo (Hamdali *et al.*, 2008b; Hariprasad *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2006), la producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminasa (Hariprasad *et al.*, 2009), entre otros. Incluso Hariprasad *et al.* (2009) proponen un método de aislamiento en el que se buscan simultáneamente microorganismos que solubilicen fosfato y produzcan ácido indolacético, a través de un medio de cultivo que permite la visualización simultánea de ambas características (Agar Pikovskaya suplementado con L-Triptófano). Por otro lado, se ha propuesto la búsqueda de microorganismos adaptados a las condiciones propias del ambiente en el cual van a ser introducidos, puesto que esto garantizará su mayor persistencia y actividad bajo las condiciones evaluadas. Por ejemplo, Johri *et al.* (1999) proponen la evaluación a la tolerancia de los MSF a diferentes concentraciones de sal, pH y temperatura, de forma que se identifiquen microorganismos adaptados a las condiciones del suelo donde serán aplicados. Así mismo, Chang y Yang (2009) sugieren el aislamiento de MSF termotolerantes para identificar cuáles de estos pueden ser aplicados en enmiendas de compost.

La susceptibilidad/resistencia de los microorganismos frente a los productos químicos aplicados para el tratamiento de la semilla o etapas posteriores del cultivo también debe ser tomada en cuenta, ya que de esta dependerán la permanencia y actividad del inoculante microbiano. Por otro lado, en caso que se proponga la aplicación de inoculantes mixtos, es necesario realizar un análisis de biocompatibilidad de los microorganismos que lo conforman, ya que es posible que alguno de ellos produzca antibióticos o metabolitos que inhiban el desarrollo de los otros (Rahi *et al.*, 2010).

Determinación taxonómica

La determinación de la afiliación taxonómica de un microorganismo es útil, porque permite relacionar si existen reportes en la literatura como promotor de crecimiento, como fitopatógeno o como agente causal de enfer-

medades para el ser humano o los animales. Además, según la *Normativa Iberoamericana para Inoculantes Formulados con Bacterias Rizosféricas Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)*, es necesario establecer la identidad (origen y taxonomía) del principio activo de los inoculantes microbianos (Red Biofag, 2008).

Con el objeto de lograr una adecuada determinación taxonómica, lo más adecuado es llevar a cabo una aproximación polifásica, la cual consiste en emplear diferentes técnicas tanto bioquímicas como moleculares para tener una mayor certeza de los resultados encontrados. El uso de técnicas bioquímicas tradicionales, acompañado de una asignación taxonómica por secuenciación de marcadores filogenéticos como el 16S DNAR para los dominios Bacterias y Archea (Weisburg *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1990), y las secuencias espaciadoras intergénicas (ITS por sus siglas en inglés), para el dominio Eucarya, son ampliamente reportadas (White *et al.*, 1990). En el caso de la asignación taxonómica para bacterias, cabe resaltar que actualmente la secuenciación del gen 16S RNAR es considerada el *gold standard* para la identificación bacteriana (Armougom y Raoult, 2009), de tal forma que se asume que dos secuencias que son muy similares entre sí (más del 97 %), deben pertenecer a la misma especie (Schloss y Handelsman, 2005).

Para llevar a cabo este proceso se requiere hacer la extracción del DNA genómico del microorganismo de interés (Ausubel *et al.*, 2003) y, posteriormente, realizar la amplificación del gen filogenético a través de la PCR utilizando cebadores (*primers*) universales diseñados para amplificar el gen 16S DNAR, tales como las parejas fD1-rP2 (Weisburg *et al.*, 1991) y 27f-1492r (Drancourt *et al.*, 2000). Para hongos se emplean parejas de cebadores universales diseñadas para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 (White *et al.*, 1990). Estas regiones poseen sitios altamente conservados que permiten el diseño de cebadores, así como regiones variables que hacen posible la discriminación taxonómica (Atkins y Clark, 2004). Además, cuando no existe una base de datos muy robusta asociada al microorganismo que se quiere caracterizar, o el taxón asociado al mismo es muy complejo, es importante hacer el análisis de genes constitutivos como el *gyr B* (que codifica para una subunidad de la girasa del DNA), o funcionales como el *nifH*, para lograr una identificación inequívoca de un microorganismo con potencial biotecnológico.

Ensayos bajo condiciones de invernadero y campo

Una de las etapas más importantes durante el proceso de caracterización de un inoculante microbiano es la validación de sus efectos sobre la planta en pruebas bajo condiciones de invernadero y campo, ya que se debe demostrar claramente que la inoculación del biofertilizante es eficaz en el mejoramiento del rendimiento del cultivo, y que reduce la aplicación de

fertilizantes químicos (Kennedy *et al.*, 2004). En el desarrollo de dichas pruebas se deben realizar ensayos en campo a gran escala para determinar cómo se comporta el biofertilizante bajo diferentes condiciones ambientales y manejos agrícolas, y de esta forma evaluar su consistencia en el tiempo (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009). Según la Red Biofag (2008), se deben realizar por lo menos pruebas durante tres ciclos agrícolas, considerando la inclusión de tratamientos con niveles intermedios de dichos compuestos, así como controles positivos y negativos con relación al efecto declarado del microorganismo.

Pruebas bajo condiciones de invernadero con microorganismos solubilizadores de fosfato

Las pruebas bajo condiciones de invernadero de MSF se han llevado a cabo utilizando arena (Wang *et al.*, 2007) y suelo estéril (Hamdali *et al.*, 2008b) como sustratos, aunque también se ha evaluado la utilización de suelo no estéril, ya que este permite además evaluar el efecto de la microflora nativa sobre el inoculante microbiano, factor que puede ser determinante para garantizar la competencia de colonización del microorganismo a nivel de campo (Rahi *et al.*, 2010; Behbahani, 2010). La forma como el microorganismo es aplicado es un factor importante que debe ser tomado en cuenta durante el proceso de evaluación de un inoculante microbiano. En este sentido, los microorganismos han sido estimados en diversas formas, entre las que se incluyen: sumergiendo las raíces de la planta o las semillas en una suspensión del microorganismo (Rahi *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2006), el cubrimiento de las semillas con la suspensión del microorganismo (Hamdali *et al.*, 2008b), la mezcla de la suspensión bacteriana con el suelo (Behbahani, 2010) o la inoculación de cada plántula en la base del tallo o al sistema radical con la suspensión del microorganismo (Pandey *et al.*, 2006; Toro *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007). Además, algunos estudios proponen la incorporación de fuentes de P insoluble al sustrato de siembra, tales como fosfato tricálcico (Jain *et al.*, 2010; Rahi *et al.*, 2010) y roca fosfórica (Hamdali *et al.*, 2008b; Toro *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007).

Por último, la selección de variables para determinar la promoción de crecimiento es un paso fundamental que determinará el éxito de la prueba de invernadero o campo. Estas variables incluyen la concentración de P foliar o en el grano (Hamdali *et al.*, 2008b; Harris *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005), la concentración de P disponible en el suelo (Kim *et al.*, 1998) y el peso y altura de la planta (Hamdali *et al.*, 2008b; Wu *et al.*, 2005). Igualmente, se recomienda monitorear la colonización del inoculante mediante la introducción de genes de bioluminiscencia (*luxAB* de *Vibrio harveyi*) (Behbahani, 2010) o resistencia intrínseca a antibióticos (Hariprasad *et al.*, 2009). Otras formas de evaluar el efecto de los MSF ha sido la utilización de isótopos

radiomarcados; en este sentido se resalta el trabajo de Toro *et al.* (1997), quienes hacen seguimiento de la solubilización y asimilación de P por la planta, como consecuencia de la inoculación conjunta de micorrizas y MSF a través de la utilización de P radiomarcado (^{32}P).

Pruebas bajo condiciones de invernadero con microorganismos fijadores biológicos de nitrógeno

Las pruebas bajo condiciones de invernadero para la evaluación de microorganismos PCV asociados a la FBN deben centrarse en mantener un número óptimo de células en el inoculante (Okon y Labandera-González, 1994); para ello, es necesario evaluar el tiempo y los métodos más adecuados de aplicación. Los métodos de aplicación con mayor uso son la inoculación de semillas y la inoculación en el suelo. El tiempo de inoculación comprende semillas inoculadas meses antes de la siembra, justo en el momento de la siembra y después de la emergencia de las plántulas (Bashan, 1998). Las semillas inoculadas en el momento de la siembra es el más usado por sus bajos costos y la facilidad en su ejecución. Sin embargo, Choudhury y Kabi (2004) sugieren que sumergir las plántulas es el mejor método de inoculación en arroz, con respecto a la aplicación de las semillas en cama o la inoculación de las semillas directamente.

Otro factor crítico para obtener un efecto benéfico en la inoculación de FBN es la concentración del inóculo. Dobbelaere *et al.* (2002) encontraron que bajas concentraciones de *Azospirillum* (10^5 - 10^6 UFC.planta $^{-1}$) estimulan el desarrollo de la raíz y peso seco de la planta, mientras altas concentraciones (10^7 - 10^8 UFC.planta $^{-1}$) no presentaron efecto o inhibieron el desarrollo de la raíz. Igualmente, intermedios y bajos niveles de fertilización incrementaron el efecto de la inoculación (Dobbelaere *et al.*, 2002). El efecto de la inoculación en la promoción de crecimiento en arroz comprende parámetros de componentes de rendimiento y calidad molinera, los cuales son comparados frente a controles comerciales y tratamientos bajo diferentes concentraciones de fertilización nitrogenada (capítulo 7).

Producción de inoculantes microbianos

Para la comercialización de un inoculante microbiano se requiere la producción masiva a través de fermentaciones líquidas o sólidas para bacterias y hongos, respectivamente. Independientemente del tipo de fermentación empleada, se deben optimizar los medios de cultivo determinando las condiciones de crecimiento adecuadas, como disponibilidad de oxígeno disuelto, pH, temperatura, uso de antiespumantes y los nutrientes adecuados. En cuanto a los nutrientes, se debe determinar la relación carbono/nitrógeno óptima, así como fuentes económicas pero suficientemente definidas para que se permita obtener un rendimiento de cultivo adecuado y reproducible,

y, lo más importante, asegurando que el principio activo siempre posea una buena actividad biofertilizante. Existen algunos microorganismos FBN, como *Azospirillum sp.*, que tienen la capacidad de formación de estructuras de resistencias como quistes y agregación de células (floculación), gracias a la presencia de altos contenidos de poli- β -hidroxibutiratos. Con el objeto de aprovechar esta característica del *Azospirillum*, es importante el diseñar de medios de cultivo que estimulen la formación de dichas estructuras, ya que aumentan la supervivencia y resistencia del inóculo en campo (Bashan *et al.*, 2004).

Formulación de inoculantes microbianos

Una formulación microbiana es una preparación que contiene una o más cepas bacterianas benéficas en una matriz de transporte que puede ser orgánica, inorgánica o sintetizada a partir de moléculas definidas (Pandey y Maheshwari, 2007). Esta debe garantizar un alto número de células en campo, asegurar la viabilidad y estabilidad fisiológica del microorganismo en el medio ambiente con el objeto de extender la vida del inóculo, y además debe caracterizarse por ser de fácil aplicación y bajo costo (Bashan, 1998). En este contexto, se debe considerar que la formulación y producción comercial de un bioinoculante requieren la integración de parámetros físicos, químicos y biológicos que permitan la supervivencia de altas poblaciones del microorganismo a lo largo del tiempo y frente a condiciones medioambientales adversas (Pandey y Maheshwari, 2007). Por lo anterior, se debe buscar una formulación que garantice la estabilidad del microorganismo durante las fases de producción, procesamiento y almacenamiento, y además facilite su aplicación en campo protegiendo este de condiciones ambientales desfavorables (Jones y Burges, 1998). Así, los componentes mínimos de una formulación son el ingrediente activo (e.g. células vegetativas vivas, esporas), un material inerte que sirva como sustrato y adyuvantes de formulación que promuevan y sustenten el funcionamiento del ingrediente activo, como por ejemplo, sustancias que confieran protección frente a la radiación UV, la lluvia, la desecación, o que promuevan su dispersión (Burges, 1998).

Actualmente, inoculantes comerciales están disponibles en presentaciones granulares, líquidas y polvos humectables (Pandey y Maheshwari, 2007), en función de la matriz de soporte que se utilice para su formulación. Por consiguiente, es válido pensar que existen diferentes materiales que pueden ser utilizados como sustratos de formulación (e.g. turba, vermiculita, suelo, talco, esferas de alginato), los cuales deben ser fácilmente esterilizables, química y físicamente uniformes, de fácil producción (e.g. que permitan la adición de nutrientes y el fácil ajuste del pH), económicos, fácilmente aplicables y compatibles con la maquinaria que utiliza el agricultor en el cultivo, y no

presentar características tóxicas para el principio activo o el medio ambiente (Bashan, 1998).

Las formulaciones comerciales de inoculantes microbianos han empleado sustratos como turba (Harris *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005), fragmentos de micelio con carboximetilcelulosa en suspensión (Hamdali *et al.*, 2008b), vermiculita, vermicompost y microperlas de alginato (Bashan *et al.*, 2004). Sin embargo, particularmente para los promotores de crecimiento vegetal asociados a la solubilización de fosfato, se ha venido evaluando la inmovilización de microorganismos en esferas de alginato de calcio, tanto en fermentación como en el sistema-planta suelo, encontrándose siempre un efecto positivo en la actividad en las células inmovilizadas (Jain *et al.*, 2010; Vassileva *et al.*, 1999). Con respecto a trabajos en campo con diazótrofos, Roy *et al.* (2010) encontraron que *Azotobacter* puede lograr incrementos hasta de un 43 % en el rendimiento de arroz, frente al control no inoculado, cuando el inóculo es aplicado en vermiculita. Igualmente, la inoculación de biofertilizantes con vermicompost bajo condiciones de campo logró incrementos significativos en componentes de rendimiento y crecimiento en arroz (Gandhi y Sivakumar, 2010).

Identificación de mercados potenciales

Las nuevas tendencias de protección al medio ambiente y de desarrollo de mercados ecológicos ha llevado a que los productores agrícolas vean la aplicación de biofertilizantes como una alternativa para disminuir los efectos ambientales negativos que ha traído el uso de agroquímicos, para prevenir el deterioro del recurso suelo y para abrirse a nuevos mercados que permitan suplir la demanda por productos orgánicos y libres de agroquímicos (Armenta *et al.*, 2010; Glass, 1993; Sanjuán y Moreno, 2010). No obstante, varios obstáculos pueden presentarse para la comercialización de nuevos productos, dentro de los cuales se destaca en primer lugar que estos, al ser compuestos por organismos vivos, deben ser producidos, formulados y vendidos de tal forma que su viabilidad y actividad biológica sean garantizadas, lo cual puede representar un reto técnico. Además, los biofertilizantes deben competir con una gran cantidad de productos químicos que son más familiares para el agricultor, lo cual se acentúa si se considera la mala reputación que pueden tener para algunos agricultores los productos biológicos, como consecuencia de resultados contradictorios en los primeros productos desarrollados (Glass, 1993). Por tanto, para sobrellevar algunos de estos inconvenientes y lograr un proceso de bioprospección exitoso es necesario el trabajo conjunto de los sectores académico, empresarial (nacional o internacional), comunitario y gubernamental (Melgarejo, 2003). Así mismo, para el desarrollo de un nuevo producto se deben tener en cuenta consideraciones como que los costos de producción deben ser minimizados para asegurar

que la venta del producto sea rentable y que la presentación del producto sea amigable para el agricultor, de manera que no se requieran nuevos equipos, técnicas o tecnologías de aplicación (Glass, 1993).

En general, la comercialización de los nuevos productos se debe realizar a través de los canales de distribución existentes, tales como compañías de semilla y sus vendedores, tiendas de agroinsumos y cooperativas de agricultores. En esta fase, es importante considerar que la publicidad y el empaque de los biofertilizantes han de ser similares al de pesticidas y otros productos familiares al agricultor (Glass, 1993). Además, la recomendación del uso de biofertilizantes debe hacerse inicialmente como un complemento a la fertilización química, con visión de sustituirla a mediano o largo plazo de acuerdo con las condiciones de suelo, manejo y respuesta del cultivo (Armenta *et al.*, 2010), de manera que no se realicen falsas promesas al agricultor que contribuyan posteriormente a la mala reputación de los productos biológicos. Entonces, la identificación de mercados potenciales y los pasos siguientes de comercialización deben ser producto de un trabajo interdisciplinario, direccionado principalmente para responder a las necesidades del agricultor de forma amigable y familiar para este.

Registro del producto para uso comercial

El registro de los productos para uso comercial dependerá de la normativa vigente de los diferentes organismos gubernamentales. Dado que los procesos de bioprospección involucran el empleo, con fines comerciales, de organismos vivos que hacen parte de la biodiversidad del país, el empleo de estos organismos debe estar en concordancia con las disposiciones legales de acceso a recursos genéticos (Chaparro-Giraldo, 2009; Melgarejo, 2003). Además, el proceso de registro involucra la recopilación de una gran cantidad de información del producto y del principio activo (microorganismo) que va a ser registrado, dentro de la cual se incluye: el análisis genético de las cepas microbianas, su pureza, el recuento mínimo de microorganismos viables y efectivos para la actividad que son recomendados, así como ensayos de actividad en laboratorio, invernadero y en campo que demuestren la efectividad y que puedan ser contrastados por el ente regulador o por instituciones que estén avaladas (Sanjuán y Moreno, 2010). Es importante incluir, además, una revisión de los posibles efectos ambientales (Glass, 1993), así como una especificación sobre los cultivos vegetales a los cuales está destinado, e información acerca de las condiciones de uso y el manejo del inoculante y sobre la susceptibilidad/resistencia del microorganismo utilizado a agroquímicos usados comúnmente en la protección de la semilla (Red Biofag, 2008).

En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es la entidad responsable de ejercer el control técnico-científico del registro, producción,

importación, comercialización y uso de bioinsumos agrícolas del tipo de agentes microbianos. A través de la Resolución 698 del 4 de febrero de 2011, dicha entidad establece los lineamientos necesarios para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola. Además, se establecen los pasos y documentos necesarios para el registro de nuevos productos, la realización de estudios de eficacia del producto por registrar e incluso de cómo deben ser los empaques y rótulos de los mismos.

Conclusiones

La bioprospección de inoculantes microbianos es un proceso complejo, que finalmente va a depender de los investigadores responsables del diseño y ejecución del proceso en su conjunto. En este sentido, su éxito estará condicionado por las decisiones que se tomen al momento del diseño, además del grado de compromiso adquirido con la rigurosidad en la ejecución de cada una de las fases incluidas en dicho diseño. Muchas de estas decisiones dependerán, a su vez, de los recursos disponibles en cada institución involucrada. Por este motivo, es fundamental que una vez se tome la decisión de iniciar un proceso de bioprospección, se haga un balance entre los objetivos planteados y los recursos disponibles para cada una de las fases comprendidas en el diseño; y en este sentido, si no se poseen los recursos y las facilidades para llegar hasta la fase de producción, formulación, pruebas de campo e incluso comercialización, es preciso buscar alianzas que faciliten la culminación del proceso. Esto con el objeto de evitar que los ejercicios iniciados se queden en cepas con potencial biotecnológico, muy bien caracterizadas, guardadas en congeladores sofisticados.

Agradecimientos

Los autores de esta investigación manifiestan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Federación Nacional de Arroceros de Colombia, entidades que cofinanciaron este trabajo a través del contrato 2007B6423 161-1020/2007. Javier Vanegas agradece la financiación por parte de la convocatoria de “Apoyo a doctorados nacionales” de 2007, de Colciencias-Icetex-SENA.

Referencias

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, & M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181.
- Ames, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. *Methods in Enzymology*, 8(1), 115-118.

- Aquilanti, L., Favilli, F., & Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), 1475-1483.
- Armenta, A. D., García, C., Camacho, J., Apodaca, M. A., Montoya, L. G., y Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*, 6(1), 51-56.
- Armougom, F., & Raoult, D. (2009). Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *Journal of Computer Science and Systems Biology*, 2(1), 69-92.
- Atkins, S. D., & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal Applied Genetics*, 45(1), 3-15.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. New York, USA: Cummings Publishing Company, Inc.
- Ausubel, F. M. et al. (2003). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley and Sons. Inc.
- Baldani, V. L., Baldani, J. I., & Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* *Biol Fertil Soils*, 30(5-6), 485-491.
- Barea, J. M., Olivares, J., y Barea, J. (1991). Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de ¹⁵N. En J. Olivares y J. Barea (Eds.). *Fijación de N y micorrizas. Fijación y movilización biológica de nutrientes* (pp. 105-124). Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Barraquío, W. L., et al. (2000). Diazotrophic enterobacteria: What is their role in the rhizosphere of rice? In J. K Ladha, & P. M. Reddy (Eds.). *The quest for nitrogen fixation in Rice*. Makati, Philippines: International Rice Research Institute.
- Barroso, C. B., & Nahas, E. (2005). The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology*, 29(1), 73-83.
- Bashan, Y., Holguín, G., & De-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 521-577.
- Bashan, Y., Holguin, G., y Lifshitz, R. (1993). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: Glick B R., Thompson J. E. (Eds). *Methods in plant molecular biology and biotechnology* (pp. 331-345). Boca Raton, USA: CRC Pres.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770.

- Behbahani, M. (2010). Investigation of biological behavior and colonization ability of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria. *Scientia Horticulturae*, 124(3), 393-399.
- Burges, H. D. (1998). *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes, and seed treatments* (p. 496). Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Academic Pub.
- Bürgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., & Zeyer, J. (2004). New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 240-247.
- Campillo, R., Urquiaga, R. S., y Pino, C. I. (2002). Fijación biológica de nitrógeno en trébol blanco mediante técnicas isotópicas del ¹⁵N, en un suelo derivado de cenizas volcánicas. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 2(1), 25-34.
- Castilla, L. A. (2006). Fertilización bio-orgánica en el cultivo del arroz. En *Biofertilización: Alternativa viable para la nutrición vegetal*. Ibagué, Colombia: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo.
- Cattelan, A. J., Hartel, P. G., & Fuhrmann, J. J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, 63(6), 1670-1680.
- Chang, C. H., & Yang, S. S. (2009). Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresource Technology*, 100(4), 1648-1658.
- Chaparro-Giraldo, A. (2009). *Propiedad intelectual en la era de los cultivos transgénicos* (1.ª ed.). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33-41.
- Choudhury, A., & Kabi, M. C. (2004). Effect of composite inoculums and methods of inoculation of bacterial fertilizer on growth and yield of rice. *Environment and Ecology*, 22(1), 871-873.
- Choudhury, A., & Kennedy, I. R. (2004). Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biology and Fertility of Soils*, 39(4), 219-227.
- Christiansen-Weniger, C., & Van Veen, J. A. (1991). NH⁴⁺-excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 3006-3012.
- Clark, F. E. (1965). Agar-plate method for total microbial count. *Methods of soil analysis. American Society of Agronomy*, 2(1), 1460-1466.
- Datta, M., Banik, S., & Gupta, R. K. (1982). Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant and Soil*, 69(3), 365-373.

- de Freitas, J. R., Banerjee, M. R., & Germida, J. J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 358-364.
- Demba-Diallo, M., Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2008). Evaluation of PCR primers for universal nifH gene targeting and for assessment of transcribed nifH pools in roots of *Oryza longistaminata* with and without low nitrogen input. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 220-228.
- Díaz-Zorita, M., & Fernández-Canigia, M. V. (2009). Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 3-11.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., & Vanderleyden, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36(4), 284-297.
- Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (1995). *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas*. Seropédica, Brasil: Embrapa-SPI.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623-3630.
- Echeverri, R., & Castilla, A. (2008). Biofertilizantes como mejoradores del proceso de nutrición del arroz. *Revista Arroz*, 56(474), 12-27.
- Elbeltagy, A., et al. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285-5293
- Gandhi, A., & Sivakumar, K. (2010). Impact of vermicompost carrier based bioinoculants on the growth, yield and quality of rice (*Oryza sativa* L.) c.v. Nlr 145. *The Ecoscan*, 4(1), 83-88.
- Glass, D. J. (1993). Commercialization of Soil Microbial Technologies. En F. B. Metting, (Ed.). *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management* (pp. 595-618). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., & Saxena, R. K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*, 40(3), 255-260.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., & Parekh, L. J. (1998). Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14 (5), 669-673.
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M. J., & Ouhdouch, Y. (2008a). Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology*, 38(1), 12-19.

- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., & Ouhdouch, Y. (2008b). Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Applied Soil Ecology*, 40(3), 510-517.
- Han, H. S., & Lee, K. D. (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil and Environment*, 52(3), 130-136.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N² fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43(8), 1185-1207.
- Hariprasad, P., Navya, H. M., Nayakaa, C. S., & Niranjana, S. R. (2009). Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biological Control*, 50(3), 307-316.
- Harris, J. N., New, P. B., & Martin, P. M. (2006). Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilising bacteria on plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1521-1526.
- Holguín, G., Guzmán, M. A., & Bashan, Y. (1992). Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, 101(3), 207-216.
- Howson, S. J., & Davis, R. P. (1983). Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(5), 377-382.
- Hu, J., Lin, X., Wang, J., Chu, H., Yin, R., & Zhang, J. (2009). Population size and specific potential of P-mineralizing and-solubilizing bacteria under long-term P-deficiency fertilization in a sandy loam soil. *Pedobiologia*, 53(1), 49-58.
- Jackson, M. L. (1973). *Methods of Soil Chemical Analysis* (pp. 38-56). New Delhi, India: Prentice Hall of India Pvt. Ltd.
- Jain, R., Saxena, J., & Sharma, V. (2010). The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. *Applied Soil Ecology*, 46(1), 90-94.
- Johri, J. K., Surange, S., & Nautiyal, C. S. (1999). Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39(2), 89-93.
- Jones, K. A., & Burges, H. D. (1998). Technology of formulation and application. In *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes, and seed treatments* (p. 496). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A., & Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1229-1244.

- Kim, K. Y., Jordan, D., & McDonald, G. A. (1998). *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8-9), 995-1003.
- Kloepper, J. W., Hume, D. J., Scher, F. M., & Singleton, C. (1988). Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Plant Disease*, 72(1), 42-46.
- Koenig, R. & Johnson, C. (1942). Colorimetric determination of phosphorus in biological materials. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 14(2), 155-156.
- Kpombekou, K., & Tabatabai, M. A. (1994). Effect of Organic Acids on Release of Phosphorus from Phosphate Rocks. *Soil Science*, 158(6), 442-453.
- Kundu, B. S., & Gaur, A. C. (1984). Rice response to inoculation with N 2-fixing and P-solubilizing microorganisms. *Plant and Soil*, 79(2), 227-234.
- Ladha, J. K., & Reddy, P. M. (1995). Extension of nitrogen fixation to rice: necessity and possibilities. *Geo Journal*, 35(3): 363-372.
- Lara, L. (2007). *Determinación del potencial agronómico de aislamientos nativos de Pseudomonas fluorescens en términos de su capacidad solubilizadora de fosfatos y antagonista contra Rhizoctonia solani*. Tesis de Maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 625-645.
- Liu, H., Wu, X. Q., Ren, J. H., & Ye, J. R. (2011). Isolation and identification of phosphobacteria in poplar rhizosphere from different regions of China. *Pedosphere*, 2(1), 90-97.
- Mehnaz, S. *et al.* (2001). Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(2): 110-117.
- Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*, 43(1), 51-56.
- Melgarejo, L. (2003). Bioprospección: Plan nacional y aproximación al estado actual en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 8(2), 73-86.
- Moreno-Sarmiento, N., Moreno-Rodríguez, L. F., y Uribe, D. (2007). Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. En M. L. Izaguirre-Mayoral, C. Labandera y J. Sanjuán (Eds.). *Biofertilizantes en Iberoamérica: visión técnica, científica y empresarial* (vol. 1, pp. 38-45), Montevideo: Denad Internacional S.A.
- Nahas, E., Centurion, J. F., & Assis, L. C. (1994). Microorganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vbrrios solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 18(1), 43-48.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270.

- Ogbo, F. C. (2010). Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. *Bioresource Technology*, 101(11), 4120-4124.
- Okon, Y., & Labandera-González, C. (1994). Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12): 1591-1601.
- Pal, S. S. (1998). Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant and Soil*, 198(2), 169-177.
- Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2007). Bioformulation of *Burkholderia* sp. mssp with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(2), 213-222.
- Pandey, A., Trivedi, P., Kumar, B., & Palni, L. M. S. (2006). Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (Bo) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya. *Current Microbiology*, 53(2), 102-107.
- Park, M. *et al.* (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2): 127-133.
- Park, J. H., Bolan, N., Megharaj, M., & Naidu, R. (2011). Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilizing bacteria (*Enterobacter* sp.). *Journal of Environmental Management*, 92(4): 1115-1120.
- Pérez, E., Sulbaran, M., Ball, M. M., & Yarzabal, L. A. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2905-2914.
- Piao, Z. *et al.* (2005). Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. *Biology and Fertility of Soils*, 41(5): 371-378.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- Prassana, R., Nain, L., Pandey, A. K., & Nayak, S. (2010). Exploring the ecological significance of microbial diversity and networking in the rice ecosystem. In P. Dion (Ed.). *Soil Biology and Agriculture in the Tropics* (p. 325). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rahi, P., Pathania, V., Gulati, A., Singh, B., Bhanwra, R. K., & Tewari, R. (2010). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, 46(2), 222-229.
- Red Biofag. (2008). *Normativa iberoamericana para inoculantes formulados con bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)*. Disponible en la web: <http://www.biofag.org.ar/documentos/RecomendacionesNormativaInoculantes-BIOFAG.pdf> [Consulta: Febrero, 2011].

- Rennie, R. J. (1981). A single medium for the isolation of acetilene-reducing (Dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1): 8-14.
- Reyes, I., Valery, A., & Valduz, Z. (2007). Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102(1): 69-75.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- Rodríguez, H., Fraga, R., González, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1-2), 15-21.
- Roger, P. A., & Watanabe, I. (1986). Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: Potentialities, current usage, and limiting factors. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 9(1), 39-77.
- Roy, B. D., Deb, B., & Sharma, G. D. (2010). Evaluation of carrier based inoculant of *Azotobacter chroococcum* strain SDSA-I12/2 in improving growth and yield of summer (ahu) rice cv. IR-36. *Biofrontiers*, 1(2), 36-40.
- Sanjuán, J., & Moreno, N. (2010). Aplicación de insumos biológicos: una oportunidad para la agricultura sostenible y amigable con el medioambiente. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 4-7.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1501-1506.
- Singh, H., & Reddy, M. S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 47(1), 30-34.
- Sundara Rao, W. V., & Sinha, M. K. (1963). Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural Science*, 33(4), 272-278.
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301-307.
- Tao, G. C., Tian, S. J., Cai, M. Y., & Xie, G. H. (2008). Phosphate-Solubilizing and Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. *Pedosphere*, 18(4), 515-523.
- Toro, M., Azcon, R., & Barea, J. (1997). Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing

- rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11) 4408-4412.
- Trivedi, P., Kumar, B., Pandey, A., & Palni, L. M. S. (2007). Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102(1): 291-299.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., & Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N_2 -fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 177(5), 1414-1417.
- Vassileva M., Azcon, R., Barea, J. M., & Vassilev, N. (1999). Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. *Bioresource Technology*, 67(3), 229-232.
- Vera, D. F., Pérez, H., & Valencia, H. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 7(1), 33-39.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., & Tripathi, A. K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3): 127-141.
- Wang, G. H., Jin, J., Xu, M. N., Pan, X. W., & Tang, C. (2007). Inoculation with Phosphate-Solubilizing Fungi Diversifies the Bacterial Community in Rhizospheres of Maize and Soybean. *Pedosphere*, 17(2), 191-199.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). New York: Academic Press.
- Wilson, K. H., Blitchington, R. B., & Greene, R. C. (1990). Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 1942-1946.
- Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., & Wong, M. H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1-2), 155-166.
- Zehr, J. P., & Montoya, J. P. (2007). Measuring N_2 Fixation in the Field. In H. Bothe, S. J. Ferguson, W. E. Newton, & B. V. (Eds.). *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 194-205). Amsterdam, Holanda: Elsevier
- Zhao, X. R., Lin, Q. M., Sun, Y. X., Zhang, Y. S., & Wang, Y. S. (2001). Phosphobacteria distribution in rhizosphere and nonrhizosphere soil of winter wheat. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 16(1), 111-115.

Índice temático

A

Abastecimiento de agua; 20
Abonos verdes; 131
Abundancia de diazotrofos; 53-69
Ácido(s)
 carboxílico(s); 99, 162
 glucónico; 160
 indolacético; 130, 162
 orgánicos; 70-72, 144, 155, 159-160
Actividad(es)
Agrícolas; 22
 β -glucosidas; 102-105
 biológica; 35, 79, 167
 celulolítica; 93, 133
 de los microorganismos; 42, 93
 enzimática(s); 21, 26, 36, 60, 61, 63, 71, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 101, 102, 105, 106, 153
 determinación de la fosfatasa; 79
 humana; 21
 ligninolítica; 93
 microbiana; 22, 25, 28, 59, 72, 80, 84, 132, 139
 nitrogenasa y proteasa; 53-67
 determinación de la; 56
Afiliaión taxonómica; 162, 179
Aislamiento(s);
 de diazotrofos; 156
 promisorios; 158
Agentes
 Inorgánicos; 23
 microbianos; 169
 orgánicos; 23
 químicos; 113
Agricultor
 necesidades del; 168
Agricultura
 global; 19
 sostenible; 22, 26, 31, 33
Agro-ecosistemas; 25, 31, 89, 111, 114
 comerciales; 114
Agroinsumos; 168
Agrosistemas de arroz; 89-109
Aislamientos bacterianos; 133

Alimentos; 19
Alternativas biológicas; 33
Ambientes ecológicos; 33
Análisis
 de *clusters*; 115-117, 119
 de componentes; 37, 40, 97-98, 125
 de correlación; 44, 46, 54, 73, 97, 102
 de DNA; 36
 de la fertilidad de los suelos; 34
 de las secuencias; 112
 estadístico de las cuatro fincas; 41
 foliar; 41
 genético; 168
Aplicación de herbicidas y pesticidas; 114
Arroz
 crecimiento en; 58, 157, 165, 167
 cultivo del; 20, 28, 41, 50, 57, 72, 99-100, 151
 ecosistema de; 25, 79, 114
 mecanizado; 20
 nutrición del; 141
 rendimiento de; 167
 rizósfera de; 27
 suelos de; 151
 variedades; 58, 90, 146
 de ciclo corto; 20
Asignación taxonómica para bacterias; 163
Ataque microbiano; 90-91

B

Bacterias
 aislamiento de; 156
 comportamiento de las; 99
 edáficas; 124
 homoacetogénicas; 100
 microaerófilas; 156
 PCV; 135, 146
 recuentos de; 95, 97
 sintróficas; 100
Biodiversidad; 168
Biofertilizante(s)
 aplicación de; 167
 empaque de los; 168
 uso de; 168

- Bioinoculante; 153, 166
Biomasa
 microbiana; 71-72, 82, 89, 114
 vegetal; 22, 131, 139
Bioprospección; 151-177
Biotecnología; 19, 25, 33, 53, 69, 89, 111, 130-131, 151
- C**
- Caja negra; 102
Calidad:
 abiótica; 21
 biótica; 21
 de molinería; 138-139, 143
Cambio climático; 19-20
Canales de distribución; 168
Capa
 anóxica; 122
 óxica; 122
Capacidadsolubilizadora; 155-156, 159-160
Catalizadores; 102
Células; 24, 91, 108, 126, 155, 165-167
 Inmovilizadas; 167
 Vegetativas; 166
Celulosa; 90-93, 102, 105, 131-132, 167
Cepas; 27, 58, 141-142, 158, 166-169
 bacterianas; 166
 microbianas; 168
 promisorias; 158
Ciclaje de nutrientes; 21-22, 28, 79, 125
Ciclo del carbono; 89, 102
Climas; 33
 templados; 33
 tropicales; 13, 22, 33
Columna cromatográfica; 160
Comercialización de nuevos productos; 167
Compañías de semilla; 168
Componente(s)
 biótico; 26
 microbiano; 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31
Composición taxonómica; 113-114
Comunidad(es)
 asociadas al suelo; 121
 bacteriana; 114-115, 122, 124
 científica; 112, 114
 de hongos; 123
 microbianas; 23-24, 95, 102, 104, 111-116, 121, 122
Condiciones de invernadero; 114, 133, 140, 158, 163-165
Control químico de enfermedades; 132
Cooperativas de agricultores; 168
Cosecha
 del grano; 28
Crecimiento(s)
 económico; 19
 micelial; 125
 resultados de; 136, 142
 vegetal; 15, 26, 29, 71, 127, 131-133, 139-144, 151-177
 promoción de; 71, 142, 152-153, 158, 159
Crisis mundial del petróleo; 19
Cromatografía; 159, 161
 de gases; 161
 en capa fina; 159
Cultivo(s)
Arroceros; 53-67, 84
 comerciales; 114
 de arroz; 13-15, 20-50, 54-66, 70-76, 79-108, 112-168
 complejos biotipos; 151
 mecanización del; 20
 sostenibilidad del; 57
 de Tolima sur; 55
 intensivo de arroz; 34, 131
 inundados; 15, 25, 27, 40, 41-45, 49, 54, 58, 74, 116-122
 sanidad del; 131
 secanos; 15, 25, 27, 41-45, 49, 54-55, 74, 85, 116-122
 vegetales; 69, 168
Curva de calibración; 60, 80
- D**
- DANE; 19
Degradación
 de celulosa; 102
 del material vegetal; 102
 física y química; 34
Densidad de siembra; 36, 38, 140
Departamento(s)
 de Tolima; 35, 54, 74, 93, 132-133
 del Meta
 sistemas de cultivo del arroz; 41
 suelos ácidos; 14, 35
 suelos arroceros; 69-87
Desarrollo(s)
 de inoculantes; 26, 29, 152, 162
 de los servicios; 22
 de microorganismos; 156
 del patógeno; 23
 procesos de escalamiento; 152
 sostenible; 14, 19, 21-31
 un inoculante microbiano; 152, 163-165
Descomposición; 22, 71, 89-90, 93, 100, 105, 132-137
 de la materia orgánica; 22
 primaria; 90, 93
Determinación; 25, 56, 60, 65, 79-80, 102-103, 108, 111-129, 153, 158-163, 174, 179

de la diversidad; 25, 111-129
 taxonómica; 153, 158, 162-163
 Diazótrofos; 53-67, 122, 151, 156-157, 161, 167
 Diagnóstico del metabolismo; 21
 Discriminación taxonómica; 163
 Diversidad; 24-27, 53, 59, 90, 93, 100-102, 108,
 111-129, 151, 168, 179-180
 bacteriana; 114
 microbiana; 24-25, 53, 108, 127, 151

E

Ecosistema(s)
 agrícolas; 14, 53, 130
 categorías
 producción de recursos; 21
 promoción de vida; 21
 regulación de los procesos; 21, 23
 control de enfermedades; 21
 servicios culturales; 21
 de arroz; 25, 79, 114
 edáfico; 28, 125
 funciones del; 24
 naturales; 112
 procesos del; 21, 23
 Efecto(s)
 ambientales; 167-168
 de la inoculación; 135, 141, 165
 de la microflora; 164
 Electroforesis; 115-120
 en gel; 112
 Enzimas celulasas; 91
 Energías fósiles; 19, 70
 Erosión
 eólica; 90
 hídrica; 90
 Especies microbianas; 113, 137
 Estado fenológico; 122
 Estimación
 de la población de microorganismos; 72
 de la población microbiana; 23, 89
 Estructura(s)
 del suelo; 23, 79, 90, 92
 estimación de la; 112
 vegetales; 89
 Evaluación en campo de microorganismos;
 131-149
 Excreción de protones; 155
 Extractos vegetales; 156

F

Factores
 abióticos; 20, 23, 102
 bióticos; 20, 23, 102
 clase de coloides; 35

ecológicos; 122
 físicos; 15, 115, 126
 químicos; 15, 115, 126
 Fases
 de almacenamiento; 166
 de producción; 166
 de procesamiento; 166
 Federación Nacional de Arroceros; 20, 29, 49-
 50, 63, 85, 105, 126, 146, 169
 Fenómeno de solubilización; 155, 159-160
 Fenotipode solubilización; 160
 Fermentaciones
 líquidas; 165
 sólidas; 165
 Fertilidadde los suelos; 34
 Fertilización
 inorgánica; 46, 49, 139
 manejo de la; 57, 142
 nitrogenada; 13, 34, 53, 57, 59, 63, 151,
 165
 orgánica; 114
 plan(es) de; 124, 133, 141
 química; 54, 168
 Fertilizantes
 aplicación de; 24, 104, 122
 inorgánicos nitrogenados; 53
 químicos; 13, 34, 122, 142
 Fijadores biológicos; 25-26, 29, 84, 161, 165
 Fincas
 arroceras; 14, 34, 37, 41, 45, 54, 71-72,
 81, 93, 105, 115-121
 comparación entre; 40
 con cultivo de arroz seco; 40
 de Meta; 39-40, 45, 58, 61, 73-74, 82,
 101, 115, 117, 119
 de Tolima; 36-40, 58-61, 73, 76-78,
 115-117, 123
 Fósforo(s)
 inorgánicos; 79
 orgánicos; 79
 Fracción
 cultivada; 111
 estable; 90
 lábil; 90
 Fuentes
 de energía; 91
 inorgánicas; 151-152
 orgánicas; 151-152

G

Genfilogenético; 163
 Genes
 análisis de; 163
 mutantes; 122
 Genoma; 24-25
 análisis del; 25

Genotipo(s)

- de la planta; 27, 57
- vegetal(es); 132

Gobierno británico

- informe del; 21

Grupo(s)

- anaerobios o anaerobios; 122
- carboxilo; 155
- de investigación; 21
- de microorganismos; 21-22, 24, 26, 53, 75, 101, 126
- filogenéticos; 24
- funcionales; 15, 22, 25-26, 29, 53, 73-85, 113, 122, 140, 145, 151-152
- hidroxilo; 155
- taxonómico; 24

H

Hemicelulosa; 90-93

Herbicidas; 20, 114, 122, 179

Hongos

- filamentosos; 28, 75, 91
- ligninolíticos; 93-105
- rizosféricos; 115, 124-125

Huella genética; 112-113, 122

Humificación; 90, 93

I

Incorporación del tamo; 28, 59, 131-134

Índice(s)

- de pilada; 135, 138-139, 142
- de riqueza; 123
- de solubilización; 159

Inoculación(es)

- de semillas; 165
- del biofertilizante(s); 163
- en el suelo; 165
- tiempo de; 165

Inoculante(s) microbiano(s); 28, 152, 162-163, 165-169

Insumos básicos; 19

Interfase aeróbica/anaeróbica; 25

Instituto Colombiano Agropecuario; 168

Inversión en el cultivo; 131

Investigación agrícola; 33

Isótopos radiomarcados; 153

L

Labranza intensiva; 34

Lignina

- degradación de la; 91, 132
- polímero sintetizado; 91

M

Macromoléculas; 90-91

Manejo(s)

- agrícola(s); 23, 111, 122, 126
- de inoculantes fijadores; 58
- integrado de plagas; 20
- poscosecha; 20

Materia orgánica; 23-14, 22-23, 26, 33-34, 38, 40, 43, 46, 48, 57, 59, 61-63, 80, 82, 89-90, 105, 124, 131-133

Material húmico; 90

Matriz de soporte; 166

Marcadores

- filogenéticos; 21, 112, 153, 163
- moleculares; 20, 25-26, 112, 126, 140

Mercados

- ecológicos; 167
- identificación de; 153, 167-168
- potenciales; 153, 167-168

Método(s)

- de aislamiento; 153, 162
- de la dilución isotópica; 161

Metabolismo edáfico; 21, 151

Microorganismos

- agentes determinantes; 21
- aislamiento de; 27, 152-153, 159
- aplicación de; 15, 44, 131-133, 142
- celulolíticos; 15, 28, 97, 99-101, 105, 139, 145
- como componentes; 21
- comunidad de; 21
- control comercial de los; 141
- de vida libre; 53, 151
- diazotróficos; 27
- endófitos; 58
- fijadores; 53, 57, 161, 165
- fotótrofos; 53, 151
- grupos de; 21, 24, 26, 75, 101
- heterótrofos; 53, 89, 151
- ligninolíticos; 89, 91, 93, 95, 97, 99-101, 103, 105, 107, 109
- microaerófilicos; 53, 151
- promisorios; 153, 158
- proteolíticos; 84
- simbióticos; 53, 60, 151
- solubilizadores; 22, 26-29, 69-73, 76-87, 132, 151-152, 154-155, 159, 164, 175, 177

Mineralización de compuestos orgánicos; 22

Modelos globales; 24

N

Naciones Unidas; 21

Necesidades

- de la planta; 69

Nichos
 comerciales; 152
 microbianos; 151
 Nitrógeno
 fijadores biológicos de; 25-26, 29, 84,
 165
 Nivel de tecnificación; 20
 Nutrientes
 ciclaje de los; 21
 fuente de; 22, 90
 transformación de; 53

O

Optimización del riego; 20
 Organismos gubernamentales; 168

P

Países productores; 131
 Paniculas
 número de granos por; 135-137, 142,
 144
 Pastoreo; 97, 99, 108, 122
 Periodos de lluvia; 20, 144
 Perfiles
 electroforéticos; 112
 genéticos; 116
 Placas tectónicas; 35
 Planta(s)
 inoculadas; 161
 peso y altura de la; 164
 Población(es)
 de bacterias; 93, 97, 102, 104, 122
 de microorganismos
 celulolíticos y ligninolíticos; 87-109
 microbiana; 23, 89
 Políticas de mejoramiento; 20
 Prácticas
 agrícolas; 14, 34, 41, 111, 119, 112, 132
 agronómicas; 111, 122, 124-125
 Procesos
 agronómicos; 89
 biológicos; 24, 28, 80
 de bioprospección; 152, 167-169
 de microorganismos; 162
 de un inoculante microbiano; 163
 de descomposición; 89, 93
 de evaluación de un inoculante
 microbiano; 164
 Producción
 agrícola; 20, 22, 54
 costos de; 13-14, 34, 51, 53, 66, 167
 de ácidos orgánicos; 70, 159-160
 de esporas; 125
 de la glicoproteína; 23
 de los granos; 20

fases de; 166
 Productos
 agrícolas; 19
 biológicos; 15, 167-168
 familiares; 168
 orgánicos; 167
 Productores agrícolas; 167
 Programa(s)
 de fitomejoramiento; 20, 27, 29
 de manejo sostenible; 21
 Protección al medio ambiente; 167

Q

Quema del tamo del arroz; 131

R

Radiación UV; 166
 Rangos críticos; 34
 Rasgos fenotípicos; 153, 158-159, 161-162
 Reacción en cadena; 112
 Recursos genéticos; 152, 168
 Registro(s)
 de departamentos técnicos; 169
 de nuevos productos; 169
 del producto para uso comercial; 153,
 168
 Relación
 biomasa/función; 125
 Rendimiento(s)
 componentes del; 137
 del cultivo; 28, 126, 163
 del grano; 135
 Región
 central; 36
 de la Orinoquía; 35
 del espaciador; 115
 del norte de Tolima; 36-37, 45
 variable; 115
 Regulación de los procesos del ecosistema; 21,
 23
 control de plagas; 23
 Residuos
 orgánicos; 89-90
 vegetales; 90, 121, 132, 134
 Revolución verde; 21
 Rotación de cultivos; 131

S

Salinidad; 20, 144
 Secuencias espaciadoras intergénicas; 163
 Sector
 agrícola; 20, 70
 Seguridad alimentaria; 19
 Selección

- de microorganismos; 152-158
 - genotípica; 27
- Semillas inoculadas; 141, 165
- Series de dilución; 156
- Servicio(s)
 - culturales; 21
 - de promoción de la vida dentro del planeta; 22
 - del ecosistema; 21
- Set de núcleos de suelo; 57
- Sistema(s)
 - de celulasas; 91
 - de cultivo; 25, 41-42, 58, 73
 - de producción de cultivo; 41
 - de riego
 - por gravedad; 35
 - secano; 81
 - de secreción de enzimas; 101
 - de siembra; 116-124
 - de tamizaje; 158
 - inundado; 36, 42, 81, 133
 - planta suelo; 167
- Sostenibilidad ambiental; 22
- Suelo(s)
 - ácidos; 13-14, 35, 41
 - actividad microbiana del; 28
 - alcalinos; 35, 49
 - análisis químico del; 34
 - arable; 20
 - arroceros; 43, 50, 56, 59, 69-87, 111-129, 140
 - de condiciones físicas y químicas; 33
 - degradación del; 21
 - estéril; 164
 - estructura del; 23, 79, 90, 92
 - fertilidad del; 22, 31, 34, 41, 45, 50, 86
 - hifas en el; 23
 - manejo del; 33, 57, 102, 111
 - neutros; 35, 45, 49
 - no estéril; 23, 158, 164
 - pobres; 20
 - productividad de un; 33
 - propiedades; 14, 23, 31, 34, 50, 86, 90, 117, 131, 151
 - químicas y biológicas del; 33
 - relaciones físicas; 33
 - rizosférico; 36-37, 54, 115, 118, 152
 - salinos; 33
 - salud del; 22, 79
 - supresivos; 23
- Suspensiones bacterianas; 159
- Sustancias
 - no húmicas; 90
 - orgánicas; 22

T

- Técnica(s)
 - bioquímicas tradicionales; 153, 163
 - cultivable y no cultivable; 26
 - de electroforesis; 112
 - de huella genética; 112, 122
 - de PCR-DGGE; 26
 - dependientes de cultivo; 111, 113, 125
 - isotópicas; 161, 171
 - moleculares; 25, 28, 111-112,
- Tecnologías de aplicació; 168
- Tierras
 - de vocación agrícola; 19
- Tipo(s)
 - de enzimas; 91
 - de fertilización; 114
- Toma de nutrimentos; 72
- Transformación de nutrientes; 53
- Tratamientos
 - con microorganismos; 141
 - con micorriza; 142, 146

U

- Unidades productivas de arroz; 21
- Unidad(es)
 - taxonómica(s) operativa(s); 26, 113
 - productoras de arroz; 124
- Universidad Nacional de Colombia
 - Laboratorio de Microbiología Agrícola de la; 36
 - Laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía de la; 141
- Urbanización de las tierras; 19
- Uso
 - de agroquímicos; 167
 - de bioinsumos agrícolas; 169

V

- Valor(es)
 - agronómico; 79
 - cuantitativos; 161
 - de pH; 49, 75, 81
- Vaneamiento
 - porcentaje de; 135-146
- Variabes
 - ambientales; 53, 111
 - de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos; 91
 - de calidad; 139
 - de crecimiento; 136
 - específicas del sitio; 90
 - físicas; 41, 45, 125
 - la selección de; 164
- Vermicompost; 167, 172

Z

Zona(s)

- andina; 35
 - arrocera de Meta y Tolima; 36
 - de cultivo; 21, 41
 - de muestreo; 97
 - Caribe húmedo; 13, 35, 70
 - Caribe seco; 13, 35, 70
 - Centro; 13-14, 35, 70
 - Llanos Orientales; 13-14, 35-36, 41, 51,
70, 87, 144
 - productora(s) de arroz; 28
 - sur de Tolima; 15, 36
- Zonación físico-química; 151

Índice onomástico

A

Abdulkadir; 75
Abou-El-Enina; 90
Abril; 97
Acosta-Martínez; 81
Aguirre-Morales, Mauricio; 11, 89
Ahmad; 161
Ahmed; 91
Alexander; 92
Alfonso-Piragua, Andrea; 89
Allison; 24, 70, 79
Ames; 159
Aminu; 75
Anderson; 115, 125
Andreev; 60
Aon; 97
Aquilanti; 156-157
Arévalo; 139
Armenta; 167-168
Armougom; 163
Aro; 132
Asakawa; 121
Atkins; 163
Atlas; 155
Ausubel; 163
Avellaneda; 60, 80, 102
Avendaño-Herrera, Diego; 89

B

Baker; 23
Baldani; 58, 156
Bandick; 102, 104
Barclay; 20
Barea; 132, 158, 161,
Barraquio; 58, 156,
Barrios; 22-24
Barroso; 154
Bartha; 155
Bashan; 132, 142, 147, 156, 165-167
Behbahani; 159, 164
Beltrán, Mayra; 69
Benedetti; 22, 25
Bigelow; 95

Bin; 26
Bodelier; 122
Bonmati; 61
Borresen; 112
Bosse; 100
Boyle; 125
Bremner; 80, 103, 160
Bronick; 132
Bucher; 97
Buchley; 111
Burges; 166
Bürgman; 161
Butler; 60-61

C

Caballero-Mellao; 27
Caicedo, Carlos; 146
Çakmakç; 132
Camelo, Catalina; 53, 69, 89
Campbell; 23
Campillo; 161
Cañizares; 102
Cardozo, Óscar; 146
Carney; 125
Castilla-Lozano, Luis Armando; 27, 33-34, 152
Cattelan; 158
Chang; 162
Chaparro-Giraldo; 152, 168
Charyulu; 57
Chen; 58, 114, 122, 151, 152, 160
Choudhury; 53, 54, 59, 132, 151, 165
Christiansen-Weniger; 58, 161
Clark; 155, 163
Cleveland; 102
Colnaghi; 58
Cook; 23
Cortés; 35, 144

D

Das; 114, 122
Datta; 27, 151, 152
de Freitas; 155, 160
Debnath; 114, 122

Del Castillo; 122, 124
Delgado, Pedro; 146
DeLong; 112
Demba-Diallo; 161
Deng; 79, 80
Devevre; 99, 100, 102
Díaz-Zorita; 142, 164
Dick; 54, 71, 79, 80, 81, 102, 104, 105
Dobbelaere; 142, 145, 165
Döbereiner; 58, 156
Dobermann; 28
Doi; 122
Drancourt; 163
Duineveld; 113
Dutta; 145

E

Echeverri; 152
Eickhorst; 125
Eilers; 99
Eivazi; 80, 104
El Fattah; 27
Elbeltagy; 58, 156

F

Fages; 132
Fairhurst; 28, 131, 132, 139
Fedearroz; 20, 27, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 45, 70,
131, 133, 139, 140
Fernández-Canigia; 142, 143, 145, 164
Florez, Nathalia; 85, 111, 114, 151
Flórez-Zapata; 111, 114, 151
Folin-Ciocalteu; 60
Fraga; 72, 75, 131, 132, 144, 145, 155, 160
Frenzel; 100
Frey-Klett; 72
Frye; 42
Fuentes-Ramírez; 27

G

Gandhi; 167
Garbeva; 23, 111
Garcés, Gabriel; 131-132, 146
Garbeva; 111, 114
Gaur; 27, 151, 152
Ge; 124
Geisseler; 60
Gelsomino; 124
Giller; 22, 23, 24
Girvan; 124
Glass; 167, 168
Glazer; 92
Godfray; 19

Gon; 100
Green; 112
Gross; 69, 70
Gu; 114, 122
Gupta; 155
Gutiérrez-Rojas, Ivonne; 89
Gyaneshwar; 58, 69, 71, 145, 159

H

Ha; 28
Hamdali; 154, 162, 164, 167
Handelsman; 163
Hariprasad; 155, 162, 164
Harris; 164, 167
Hartmann; 121
He; 69
Heuer; 113
Horwath; 60, 99, 100
Hovig; 112
Howard; 91, 92

I

Igual; 69

J

Jackson; 42, 53, 54, 61, 159
Jain; 164, 167
Jellison; 101
Jiménez, Carlos; 146
Johri; 162
Jones; 166
Juma; 71, 80

K

Kabi; 165
Kausar; 132
Kennedy; 27, 53, 54, 59, 131, 132, 151, 156, 157,
158, 164
Khush; 41
Kiiskinen; 94
Kim; 154, 164
Kimura; 100, 121
Kirk; 112, 113, 114
Kloepper; 71, 158
Knight; 104, 105
Koenig; 159
Kpombekou; 155
Kruskal; 135
Kumura; 136, 142, 144
Kundu; 27, 151, 152
Kurakov; 139

L

Labandera-González; 142, 152, 165
 Ladd; 54, 60, 61
 Ladha; 58, 156
 Lal; 32
 Landgridge; 20
 Lara; 80, 156
 Lasheras; 91
 Lauber; 79
 Leganes; 59
 Lemos-Gordo, Sylvia Natalia; 89
 Li; 70, 71
 Liesack; 25, 42, 53, 55, 100, 122, 151
 Liu; 152, 155, 159
 Lopes; 114
 Lucy; 132, 145
 Luna, José Neftalí; 11

M

Magurran; 115
 Malagón; 35, 41, 45
 Man; 28
 Marentes, Francy; 131
 Maron; 55
 Marshner; 72, 75
 Mårtensson; 57
 Martínez-Argudo; 59, 60, 81
 Martiny; 24, 70
 Maskey; 57
 Matiz-Villamil, Adriana; 89
 Matsuo; 136, 137, 142, 144
 Mazzola; 23, 24
 Mehnaz; 156
 Mehta; 155
 Melgarejo, Luz Marina; 53, 69, 89, 152, 167, 168
 Méndez-Pedraza, Johanna Milena; 89
 Microfertisa; 133, 140
 Mirchink; 139
 Montenegro-González; 23, 46
 Morales; 89, 97
 Moreno; 27, 92, 152, 167, 168
 Murase; 122
 Muthukumarasamy; 122
 Muzzer; 112, 113, 115
 Myrold; 22

N

Nahas; 154
 Nakas; 132
 Nakatsu; 113, 114
 Nannipieri; 111, 114
 Nautiyal; 72, 154, 155, 159
 Neue; 100
 Nielsen; 111

Nocker; 111, 114
 Nogueira; 111
 Núñez-Arbeláez, Ángela Judith; 89

O

Ogbo; 154
 Okon; 142, 152, 165
 Omar; 142
 Ortiz-Moreno; 92
 Ospina; 131, 132
 Ovando-Chacón; 91
 Ovreas; 114
 Owen; 45, 70

P

Pace; 112
 Páez; 93
 Pandey; 19, 162, 164, 166
 Panhwar; 27
 Parao; 144
 Park; 156, 160
 Parra-Fajardo, Luz Natalia; 89
 Pascual; 80
 Patel; 69, 71, 75
 Pedraza; 89, 142
 Pedziwillk; 75
 Perafán, Ricardo; 146
 Perdomo; 44
 Pérez; 154, 159, 160
 Piao; 151
 Pielou; 115, 123
 Podile; 145
 Ponnampereuma; 41, 42, 131
 Prassana; 20, 25, 33, 151
 Pretty; 20

Q

Quintero; 34, 53

R

Rahi; 154, 159, 162, 164
 Ramírez; 27, 71
 Ramsay; 92
 Rao; 57, 59, 154
 Raoult; 163
 Ratering; 42
 Read; 22
 Reddy; 152, 154, 156, 160
 Rennie; 54, 156, 157
 Reyes-Pineda, Édgar; 89, 152
 Richardson; 69, 71
 Rilling; 23

Rodríguez, Janeth; 33, 53, 72, 75, 89, 131, 132,
144, 145, 155, 160

Roger; 53, 54, 59, 151

Rousk; 125

Royer; 132

Rubin; 112

Rudresh; 139

Rutigliano; 24

S

Sánchez; 45, 70, 91, 92

Sanjuán; 167, 168

Sardans; 62

Sass; 100

Scheublin; 22

Schloss; 163

Schmeisser; 24

Schmidt; 111

Schnell; 42

Schnitzer; 60

Schulten; 60

Scow; 90

Senthilkumar; 58

Shannon-Weiner; 111, 112, 113, 115, 123

Shiga; 44

Shrestha; 57

Silver; 56, 59

Singh; 112, 114, 152, 154, 160

Sivakumar; 167

Sleator; 24

Smith; 22, 53, 54

Stricklan; 125

Sturz; 58

Swamy; 92

T

Tabatabai; 54, 71, 79, 80, 81, 103, 104, 155, 160

Tao; 154, 155, 159

Tester; 20

Tibatabai; 71

Tiwari; 132

Toro; 154, 164, 165

Torrent; 69

Trasar-Cepeda; 104

Tringe; 112

Trivedi; 27, 152

Tukey; 43, 48, 55, 59, 62, 94, 95, 96, 103

Tuomela; 91, 92

U

Ueda; 54, 151

Ullah; 92

Uribe-Vélez, Daniel; 92, 111, 114, 131, 134, 151

V

Van Veen; 161

Vanderleyden; 58

Vanegas, Javier; 33, 53, 63, 69, 131, 146, 151,
169,

Vargas-García; 42, 132, 151

Vassileva; 167

Vera; 156

Verma; 58, 156

W

Wagner; 90

Waldrop; 24

Waliszewski; 91

Wallis; 74, 81, 135

Wang; 62, 104, 164

Wartiainen; 26, 122

Watanabe; 53, 54, 59, 122, 151

Weisburg; 163

Wenhui; 122

Weyman-Kaczmarkowa; 75

White; 163

Widmer; 121

Wilson; 136, 137, 142, 163

Winding; 111

Woese; 112, 113

Wolf; 90

Wu; 164, 167

Y

Yadav; 71

Yagi; 100

Yang; 97, 162

Yanni; 27

Yarzabal; 22, 27, 69, 70, 71, 72, 75

Yoshida; 150

Z

Zech; 90

Zehr; 161

Zeigler; 20

Zhao; 154, 155

Zheng; 111

Zuberer; 56, 59

**Ecología de microorganismos
rizosféricos asociados a cultivos
de arroz de Tolima y Meta**

Esta edición consta de 350 ejemplares.
Se imprimió en marzo de 2012 en la Editorial
Universidad Nacional de Colombia. En su
composición se utilizaron caracteres Minion
Pro 10,5/13 puntos, en formato de 16,5 x 24
centímetros. La carátula va en propalcote de
240 gramos y las páginas interiores en bond
de 90 gramos.
Bogotá, D. C. Colombia

El arroz es el cultivo de ciclo corto más importante en extensión en Colombia gracias a las 460 000 hectáreas que en promedio se siembran anualmente. En Colombia, históricamente, se ha realizado un manejo intensivo del cultivo de arroz lo que ha generado el deterioro de las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo, reflejado en procesos intensivos de compactación, erosión y pérdida de materia orgánica del suelo.

Este libro describe a partir de herramientas basadas en microbiología clásica, bioquímica y biología molecular, el componente biológico del suelo asociado a 16 fincas arroceras de los departamentos de Tolima y Meta, y su interacción con los componentes físicos y químicos del suelo. Esto con el objeto de entender el papel de los diferentes grupos funcionales de microorganismos en la dinámica y asimilación de nutrientes en el cultivo del arroz, con miras al diseño de estrategias para mejorar los procesos en beneficio de la planta.



Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural
República de Colombia

Libertad y Orden



Biocultivos
S.A.

