

VI. POTENCIAL DE LAS BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN EL CULTIVO DE LA CAÑA PANELERA

Luz Ayda Moya Alvarez
Investigadora - Programa Regional Agrícola
Regional Uno - CORPOICA

El cultivo de la caña de azúcar o caña panelera posee propiedades particulares en relación con su interacción con los **microorganismos del suelo**, que permiten que parte de sus requerimientos nutricionales sean suplidos por la asociación con dichos organismos. Es el caso de algunos minerales como el **fósforo y el nitrógeno**.

En el caso del fósforo, este puede ser transportado, aunque no sintetizado tanto por bacterias como por hongos del tipo micorrizas. Sin embargo, para que este tipo de asociaciones sea efectiva, es necesario que el fósforo esté presente en el suelo.

En el caso del **nitrógeno**, que es el tema de esta conferencia, se presentan **las bacterias fijadoras de N₂**, también llamadas **bacterias diazotróficas**, que también están presentes en la rizosfera de gramíneas y cereales. En las especies C₄, particularmente cuando están creciendo en suelos deficientes en N, en los trópicos, estas bacterias pueden contribuir substancialmente a la nutrición nitrogenada de las plantas. En climas temperados, sin embargo, la estimulación del crecimiento por bacterias diazotróficas es más probablemente por efectos hormonales. Ciertas especies de bacterias, por ejemplo, producen fitohormonas, que aumentan, entre otros, la formación de pelos radiculares y la iniciación de raíces laterales. El aumento en el área superficial de la raíz puede resultar en aumentos considerables en la adquisición de P y en el crecimiento de la planta, en suelos con deficiencia de P.

En el caso de la asociación con **bacterias fijadoras de nitrógeno (bFN)**, no se requiere que el nitrógeno se encuentre en el suelo. El nitrógeno atmosférico, N₂, es reducido, por acción de la enzima nitrogenasa, a NH₄⁺, que puede ser utilizado por la planta.

Contribución de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el cultivo de la caña

Uno de los primeros hallazgos, que condujo a investigaciones más profundas, fue que las bFN eran más abundantes en la rizosfera de la caña que en el suelo circundante. Desde 1958 se observó que en Brasil, la caña de azúcar no responde a la fertilización nitrogenada, probablemente porque, como la caña es propagada vegetativamente, sería posible que las estacas aportaran energía para los microorganismos fijadores de nitrógeno (bFN) de la rizosfera, que proporcionarían energía para el desarrollo de la caña (Alvares et al., 1958).

La actividad nitrogenasa fue observada en las raíces y en las partes externas de cortes de tallo germinados, de donde los microorganismos fijadores de N fueron obtenidos en cultivos. Se ha observado que si se siembran estacas de caña, esterilizadas superficialmente, en vermiculita estéril, se presenta actividad nitrogenasa en la vermiculita. El análisis anatómico de dichos cortes de caña muestra rupturas elongadas o huecos en la base de las raíces, alrededor de los cuales las bacterias se

agrupaban. Probablemente estas zonas son los lugares por los cuales las bacterias son transportadas inicialmente, para obtener acceso a la rizosfera (vermiculita) (Patriquin et al. 1980).

En los primeros trabajos sobre FBN en caña identificaron *Beijerinckia* como la principal bFN en esta asociación. El aislamiento de las bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico se hace mediante las siembras en medios sin nitrógeno, donde solo crecen los microorganismos que posean un sistema enzimático tal, que les permita reducirlo y utilizarlo en su metabolismo.

En 1978, Ruschell & Ruschell inocularon segmentos de raíces en medios libres de nitrógeno, con glucosa y malato, aislando un amplio rango de organismos que incluían *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Vibrio* y *Bacillus polimyxa*. Luego se demostró la presencia de otras bacterias dentro de tallos de caña: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Erwinia herbicola* y *B. polimyxa*. La presencia de algunos de estos géneros en tallos y raíces estériles o no, es mostrada en la Tabla 1. Estos datos muestran la gran riqueza, tanto del suelo como de la planta, de microorganismos con capacidad de contribuir en la nutrición de la caña.

La naturaleza de la asociación de diferentes gramíneas con bacterias diazotróficas ha sido estudiada con más detalle en la última década, así como algunos aspectos cuantitativos referentes a este sistema. No se conoce la respuesta de la planta de caña a la inoculación de microorganismos, porque mayoría de los trabajos se han hecho bajo condiciones de solución nutritiva o en suelo y campo usando cultivos modificados. Sin embargo, debería ser estudiado el efecto de la irrigación y de la adición de K y elementos menores sobre la FBN.

Tabla 1. Porcentaje de bacterias aisladas de plantas obtenidas de cortes de caña esterilizados o no esterilizados superficialmente, plantados en vermiculita estéril (Patriquin et al. 1980).

Bacteria	No esterilizado		Esterilizado	
	Raíz	Cultivo	Raíz	Cultivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	17	0	0
<i>Erwinia herbicola</i>	67	50	0	0
<i>Bacillus polimyxa</i>	17	13	0	0
Desconocido	0	0	100	70

Efecto de las variedades sobre la fijación biológica de nitrógeno

Estudios recientes realizados en el Brasil han mostrado que algunas variedades de caña de azúcar, son capaces de obtener más del 60 % de su requerimientos de nitrógeno a través de la fijación biológica de nitrógeno, es decir el equivalente a más de 150 kg. N/ha/año. La razón para dicho comportamiento podrían ser las bajas dosis de nitrógeno utilizadas sistemáticamente para obtener altos rendimientos en dicho cultivo (Boddey et al., 1995). Estos estudios han sido posibles gracias al uso de $^{15}\text{N}_2$.

Para los estudios con $^{15}\text{N}_2$, la planta completa, o al menos la raíz, es expuesta a una atmósfera enriquecida con $^{15}\text{N}_2$ por un período de tiempo apropiado, durante el cual las bacterias asociadas, si las hay, fijan el nitrógeno marcado, que es determinado después en la, de donde se obtiene el porcentaje de nitrógeno obtenido por fijación biológica. Es posible entonces reconocer cuál nitrógeno proviene del suelo y cual fue el fijado de la atmósfera. (Vose et al., 1981).

La Tabla 2 muestra los resultados reportados por Boddey (1995), que indican que existen diferencias en la habilidad para fijar nitrógeno por diferentes variedades de caña de azúcar. En dicho trabajo se utilizó *Brachiaria arrecta* como planta control que no fija nitrógeno. Se evaluó también una variedad de *Saccharum spontaneum* (krakatau), que también mostró altas tasas de FBN después de 3 años de evaluación.

Los cruces de variedades con alta capacidad de fijación, con variedades de baja capacidad fijadora, resultan variedades de capacidad de FBN intermedia. (Tabla 3). Esta podría ser una característica a ser tenida en cuenta para el mejoramiento de las variedades. Esto es particularmente cierto para plantilla (primer corte) (Ruschell & Ruschell., 1978).

Así mismo, se ha observado que podría también existir especificidad de la bacteria, de acuerdo con la vía fotosintética de la planta. Al parecer la asociación con bacterias C4 es más frecuente con *Azospirillum lipoferum*, mientras que las planta C3 son más infectadas por *Azospirillum brasilense*.

Tabla 2. Acumulación de ^{15}N y N total en caña de azúcar y *Brachiaria arrecta* y estimación del N derivado de la FBN. Promedio de cuatro réplicas (Boddey et al. 1995).

Variedad o especie	Contenido final de N en suelo (g/m ²)	N acumulado en planta 3 años (g/m ²)
CB 47-89	835	61.4 bc
CB 45-3	864	84.3 ab
NA 56-79	884	57.8 c
IAC 52-150	924	59.6 bc
SP 70-1143	852	77.5 bc
SP 71-799	860	56.9 c
SP 79-2312	845	63.6 c
<i>Brachiaria arrecta</i>	830	24.9 d

Tabla 3. Actividad nitrogenasa (nmol C₂H₄ producido/planta por ha) de padres y progenies de cruces de diferentes variedades de caña de azúcar (Boddey et al. 1995)..

Identificación	Relación	Nivel de Fijación de N
CP 36-105	P1	108.2
CP 38-34	P2	875.7
CP 40-124	F1- A	260.9
CP 52-48	F1- B	189.3
CO 301	P1	166.1
CO 290	P2	188.1
CB 45-3	F1	335.6

Bacterias diazotróficas productoras de fitohormonas

A pesar de que las plantas son capaces de sintetizar fitohormonas, también pueden responder a aplicaciones exógenas de estas sustancias durante ciertas fases del crecimiento, y bajo ciertas condiciones de cultivo. Si se tiene en cuenta que bajo condiciones climáticas y ambientales sub-óptimas puede ser que las plantas no sean capaces de sintetizar suficientes fitohormonas endógenas

para el óptimo crecimiento y desarrollo, adquiere importancia que estas actividades sean realizadas por las bacterias.

En la rizosfera están presentes numerosas especies de microorganismos capaces de producir fitohormonas. En un estudio se encontraron que de 50 aislamientos 86% eran capaces de producir citoquininas, 58% giberelinas y 90% auxinas. Sin embargo algunas especies en algunos cultivos en particular, tienen esta capacidad aumentada.

En la rizosfera de la caña de azúcar se encuentran microorganismos capaces, simultáneamente de fijar nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas. Dentro de estos están los géneros *Azotobacter*, *Acetobacter* y *Azospirillum*.

El género *Azotobacter* fue descubierto por Beijerinck en 1901, e inmediatamente después de este descubrimiento se iniciaron trabajos experimentales en Rusia para utilizar la habilidad de *Azotobacter* para fijar nitrógeno atmosférico molecular y aumentar los rendimientos de varios cultivos. Hasta la mitad del siglo XX se hizo intensa investigación en Rusia en la inoculación de *Azotobacter*, observando resultados que iban desde ningún efecto hasta efectos altamente significativos. Estos resultados prometedores atrajeron la atención del All-Unión Research Institute of Agricultural Microbiology, de la Unión Soviética. Se iniciaron entonces estudios sobre efectos en la producción. En 1937 se inició la preparación comercial de azotobacterias, bajo el nombre de Azotogen (más tarde denominado Azotobacterin) para el tratamiento del suelo y de la semilla. En 1958 más de 35 millones de hectáreas en la antigua Unión Soviética habían sido tratadas con esta preparación bacteriana. En muchos casos, se mostraban efectos significativos en la producción de los cultivos inoculados, en particular en cultivos de jardín con aumentos de 10 al 70%. Sin embargo, fuera de Rusia e India, muchos científicos no confirmaban los hallazgos de los científicos soviéticos. El interés se renovó en los 60s, cuando un grupo de microbiólogos de la Estación Experimental de Rothamsted, Reino Unido, donde se llevaron a cabo una serie de experimentos adecuados y bien diseñados, que confirmaron muchas de las observaciones soviéticas. Hoy estas preparaciones son usadas en varios países a escala comercial.

Durante los 70 se investigó bastante en relación con asociaciones planta-microbio, como simbiosis asociativas, que se relacionan con el suministro de N para el crecimiento de no leguminosas. Una buena parte de esta información tiene que ver con diazótrofos habitantes de raíz y rizosfera en pastos y cereales y se han hecho esfuerzos para evaluar la eficacia de bacterias como *Azospirillum* por su habilidad para aumentar el rendimiento de algunos cultivos. Así como se han reportado aumentos significativos en rendimiento por algunos autores, otros ensayos no indican ningún beneficio de la inoculación.

Es cada vez más claro que muchos factores, tanto bióticos como abióticos pueden influir en el desempeño de estas asociaciones. El potencial redox y el contenido de agua están entre los factores que limitan esta asociación. Claramente, los factores ambientales del suelo pueden causar modificaciones y aún se requieren más investigaciones. Se ha estudiado durante varios años el impacto de varios factores ambientales en la tasa de fijación de N. Han demostrado que la fijación aumenta notablemente cuando la presión de oxígeno (p_{O_2}) alrededor del sistema radicular intacto se reduce hasta 2,1 nmol C_2H_2 . Abajo de este nivel la actividad disminuye, presumiblemente porque las bacterias asociadas con las raíces son incapaces para generar suficiente energía para mantener activo el sistema nitrogenado. A niveles de p_{O_2} altos se producen efectos tóxicos del O_2 sobre la nitrogenasa. Esto indica que los sistemas raíz-microbio responden al O_2 como organismos microaerofílicos. Esto es consistente con la naturaleza microaerofílica de muchos diazótrofos que tienen sensibilidad al O_2 . Esto tiene grandes implicaciones en situaciones en el campo. Si la

actividad nitrogenasa responde de esta forma, podría sugerirse que en los suelos arcillosos se tendría mejor FBN. Es posible que en suelos inundados la FBN ocurra en micrositos de anoxia, hipoxia o sitios microaeróbicos dispersos en el sistema radical.

Avances en la investigación - CORPOICA

En el Laboratorio de Microbiología del Programa Regional Agrícola, realizamos el aislamiento de tres cepas nativas de *Azotobacter* spp. y tres de *Azospirillum* spp. asociadas al cultivo de caña panelera del occidente de Cundinamarca y denominadas Ab-1, Ab-2, Ab3 y Az-1, Az-2 y Az-3 respectivamente. Fue evaluada su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, *in vitro*, donde se observó que una de las cepas de *Azotobacter*, la Ab 2, tiene una alta capacidad de fijación de N₂, hasta 5 veces mayor que la de las otras cepas aisladas. Su actividad alcanzó hasta 270 nmol C₂H₂/ml. Esta característica deberá ser evaluada con detalle, con el fin de encontrar la relación entre la capacidad de fijación de N₂ *in vitro*, con la capacidad *in vivo*. Estos resultados son mostrados en la Figura 1.

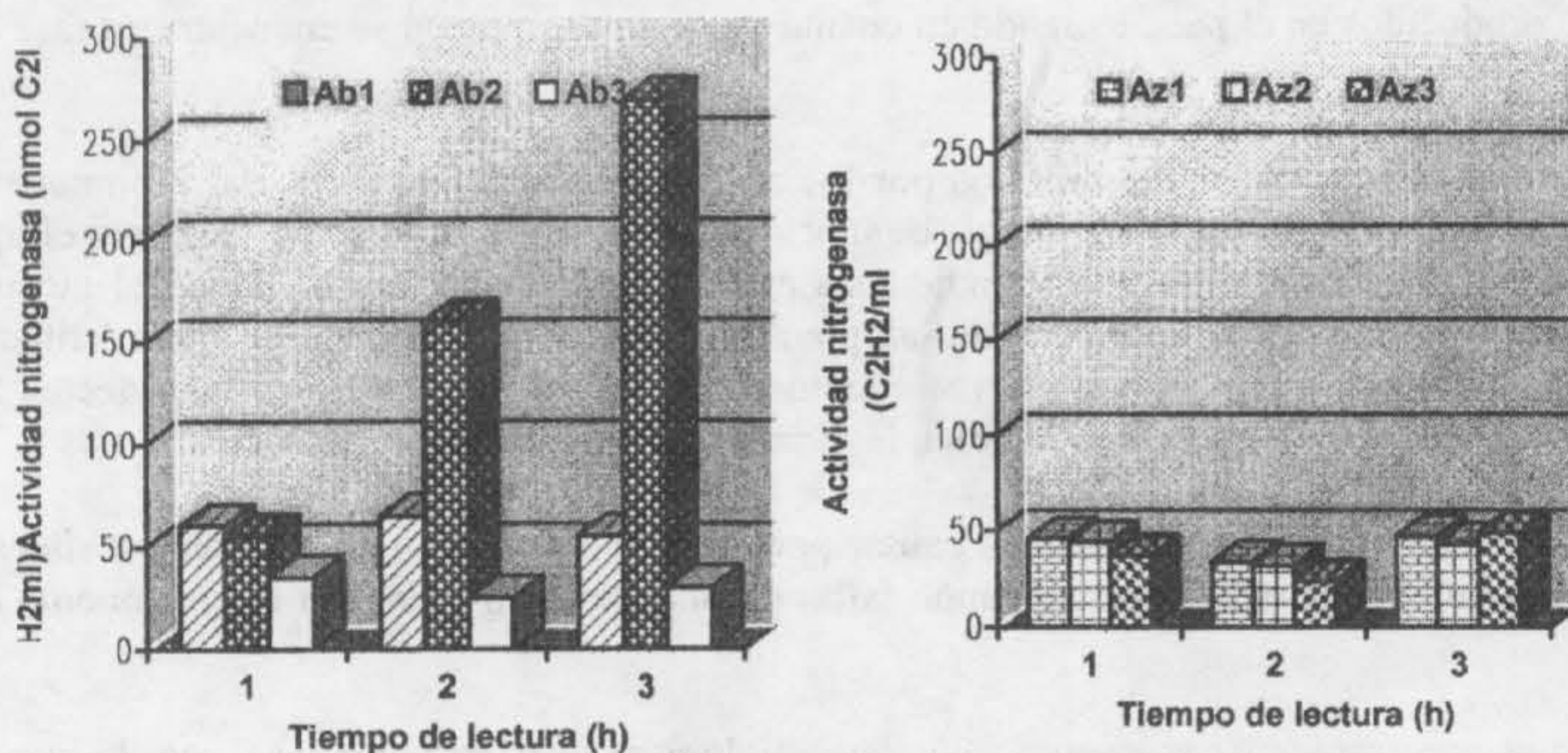


Figura 1. Actividad nitrogenasa de seis cepas de bacterias diazotróficas aisladas de la rizosfera de caña panelera en el occidente de Cundinamarca. Ab: *Azotobacter*, Az: *Azospirillum* (Orjuela & Parra, 1997).

En dicho estudio se determinó, además, la sobrevivencia en turba de una cepa de cada uno de los géneros aislados, Ab1 y Az1, con el fin de evaluar la posibilidad de utilizar este material como soporte para el biofertilizante, en caso de que investigaciones posteriores den resultados promisorios del efecto de la inoculación de bacterias diazotróficas sobre diversos cultivos. Se observó una alta sobrevivencia de las dos cepas, con valores mayores de 10⁹ ufc/g al cabo de tres meses de preparado el inoculante, lo que indica que la turba tiene cualidades que le permitirían ser utilizado. Se requieren estudios sobre la infectividad y efectos colaterales de la turba sobre las bacterias.

Uso de inoculantes microbianos en diferentes cultivos

De acuerdo con Döbereiner (1982) la necesidad, especialmente en los países en desarrollo, obtener cereales y pastos que satisfagan al menos parte de sus requerimientos de nitrógeno a través de la fijación biológica de nitrógeno ha inducido la realización de múltiples estudios con cepas *Azotobacter* y *Azospirillum* disponibles de forma inmediata, y que sean usados como inoculantes independientemente de su origen o de la adaptación al huésped evaluado.

Cada día hay mayores evidencias de que la inoculación con *Azospirillum* puede proporcionar forma significativa el crecimiento de las plantas, el nitrógeno de la planta y aún en la producción grano bajo condiciones de campo. En Brasil se tienen datos promisorios en relación con el efecto de la inoculación de *Azospirillum*, en comparación con la adición de materia orgánica y fertilizante nitrogenado, en campo, llegando a obtener aumentos en el N de la planta de 36-44 Kg N / ha cercano a lo obtenido con fertilizante nitrogenado (Döbereiner, 1982).

El uso de inoculantes microbianos, frecuentemente referidos como rizobacterias promotoras de crecimiento, es ahora una práctica común en muchas regiones del mundo y varios inoculantes (biofertilizantes) están disponibles comercialmente bajo diferentes marcas.

En Colombia no hay hasta el momento disponibilidad de inoculantes de bacterias diazotróficas asimbióticas, producidos en el país, teniendo en cuenta que este campo aún se encuentra en fase de investigación.

La falta de entendimiento de los mecanismos por los cuales un inóculo en particular promueve el crecimiento de las plantas, limita la tecnología de inoculación. Poco se sabe acerca de como el tipo de suelo, el genotipo del huésped y las condiciones ambientales afectan la habilidad del inóculo para colonizar y persistir sobre las raíces de las plantas. Inóculos procedentes de otras latitudes pueden presentar fallas para promover el crecimiento como resultado de factores que afecten la actividad metabólica y fisiológica como también la dinámica poblacional en la rizosfera.

Condiciones diferentes a las óptimas pueden causar poca o ninguna fijación de nitrógeno o síntesis de fitohormonas en la zona radical, ocasionando fallas del inóculo para promover el crecimiento de la planta.

A largo plazo es necesario tener en cuenta soluciones biológicas, más que químicas, para lo que es un problema esencialmente biológico. El efecto de los químicos agrícolas sobre el aumento en la producción de las plantas ha sido llamado un milagro de nuestra edad tecnológica pero su uso puede hacer peligrar la seguridad y la sostenibilidad de la producción (Ashton & Gaftis, 1990).

De acuerdo con Döbereiner (1982) las tecnologías emergentes de la última década de investigación sobre fijación de nitrógeno en pastos y cereales indican las siguientes posibilidades:

- Maximización de la fijación espontánea de N_2 por el uso apropiado de fertilizante (por ejemplo altos niveles de fósforo, complementados con molibdeno).
- Manejo de los cultivos para aumentar la fijación de N_2 .
- Inoculación con la cepa apropiada de *Azospirillum* o de otra bacteria fijadora de N_2 . Estas cepas deben ser evaluadas en el campo y en suelos donde haya poca o ninguna bacteria de estos géneros. Además deben ser realizados experimentos de competencia en suelos donde ya existe una bacteria.

- Debe ser mejor explorada la interacción de genotipos de las planta y de las bacterias y bajos niveles de aplicación NO_3^- , ya que estas son claves para complementar la fijación biológica de nitrógeno con el uso de fertilizante nitrogenado en pastos y cereales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALVARES, R., SEGALLA, A.L. & CATANI, R.A. 1958. Adubação de cana-de-açúcar. III. Fertilizantes nitrogenados. *Brtagantia* 17, 141-146.
- ASHTON & GAFTS, F.M. & A.S. 1990. Mode of action of herbicides. John Wiley & Sons, New York, Council for Agricultural Science and Technology. Pesticides and safety of Mits and vegetables. Comments from Cast, no. 1990-1 Cast, Ames IA).
- BODDEY, BODDEY, R.M. et.al. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant an soil*. 174, 195 - 209.
- DÖBEREINER, J. (1982). Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative N_2 fixing organisms. In: GRAHAM, P.N & HARRIS, S.C. 1981. Biological Nitrogen Fination Technodgy for Tropical Agriculture Workshop. CIAT Cali.
- ORJUELA, D.L.. & PARRA, S.D. 1997. Aislamiento de *Azotobacter* y *Azospirillum* spp. de suelos cañeros de Cundinamarca y evaluación como biofertilizante de *Saccharum officinarum* en invernadero. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Bacteriología. Tesis Pregrado.
- PATRIQUIN, D.G., GRACIOLLI, L.A. & RUSCHEL, A.P. 1980. Nitrogenase activity of sugarcane propagated from stem cuttings in sterile vermiculite. *Soil Biology and Biochemistry*. 12 :413-417.
- RUSCHELL, A. P. & RUSCHELL, R. 1978. Varietal differences affecting nitrogenase activity in the rhizosphere of sugarcane. *Technologists*. Vol 2 :1941-1948.
- VOSE, P.V., RUSCHELL, A.P., VICTORIA, R.L. SAITO, S.M.T. & MATSUI, E. 1981. $^{15}\text{N}_2$ as a tool in biological nitrogen fixation research. In: GRAHAM, P.N & HARRIS, S.C. 1981. Biological Nitrogen Fination Technodgy for Tropical Agriculture Workshop. CIAT Cali.