

# Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de *Chenopodium quinoa* Willd. (quinua)

<sup>1</sup> Janeth Gutierrez; <sup>2</sup> Joseph Felipez; <sup>1</sup> Marvel Navia; <sup>1</sup> Noel Ortuño

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias - Universidad Mayor de San Simón  
<sup>2</sup> Fundación PROINPA

E mail: marvelnavia@gmail.com

**Resumen.** Se evaluaron 21 cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de quinua, provenientes del cepario de PROINPA, éstas se activaron en el *Laboratorio de Microbiología*, sometiéndolas a la prueba para fijación de nitrógeno en dos tipos de medio de cultivo, uno selectivo y otro diferencial. Con esta prueba se seleccionó 8 cepas, las que luego fueron evaluadas en invernadero, bajo un diseño de Bloques al Azar, con 10 repeticiones, donde estas cepas, más tres productos comerciales (Graminante, Azozim, Dimazos), se combinaron con dos niveles de urea: 0 y 174 kg/ha. Las variables de respuesta fueron rendimiento, peso de panoja, longitud, peso y volumen de raíz, altura de planta, longitud y diámetro de panoja, y UFC/g de *Bacillus* totales en la rizosfera. Después de esas evaluaciones fueron seleccionadas las cepas 101J, 103J y 2C, por inducir mayor rendimiento en grano, peso de panoja, longitud de raíz, altura de planta, longitud y diámetro de panoja, de acuerdo al análisis de Clúster.

**Palabras clave:** Fijación Biológica de Nitrógeno; Simbiosis; Biofertilizantes, *Bacillus*.

**Summary: Selection of nitrogen-fixing bacteria in plants of *Chenopodium quinoa* Willd. (quinua)** From PROINPA lab, twenty-one strains of nitrogen-fixing bacteria were evaluated in quinoa crop. These were activated in the Microbiology Laboratory, subjecting them to the test for nitrogen fixation in two types of culture media, one selective and the other differential. With this test, 8 strains were selected, which were then evaluated in the greenhouse, under a randomized block design, with 10 replications where, these strains plus three commercial products (Graminante, Azozim, Dimazos), were combined with two levels of urea: 0 and 174 kg/ha. The response variables were yield, panicle weight, root length, weight and volume, plant height, panicle length and diameter, and CFU/g of total *Bacillus* in the rhizosphere. After these evaluations, strains 101J, 103J and 2C were selected, for inducing greater grain yield, panicle weight, root length, plant height, length and panicle diameter, according to the Cluster analysis

**Keywords:** Biological Nitrogen Fixation; Symbiosis; Biofertilizers, *Bacillus*.

## Introducción

La quinua es cultivada en la región andina desde hace miles de años. Está ligada a la tierra, a las comunidades campesinas y a las culturas de los pobladores de estas zonas.

En la actualidad, su cultivo se encuentra en franco proceso de expansión, tanto en la región como fuera de ella, por ser a la vez más valorada por sus propiedades nutritivas, agronómicas y organolépticas, representando una gran oportunidad para mejorar las condiciones de vida de los pobladores de Los Andes y del mundo moderno.

Sin embargo, el incremento del cultivo de quinua también está asociado a la sobre explotación, causando daños ambientales con fuertes implicaciones en la fertilidad de los suelos, poniendo en riesgo el hábitat de las especies y el equilibrio del ecosistema (Toledo 2013).

La falta de incentivos, conocimiento, y formulación de programas agroecológicos, entre otros factores, han sobrellevado a la comunidad al mal uso del control químico de insectos no benéficos y enfermedades, además del manejo de la fertilización química; estos aspectos están causando daño ambiental e importantes pérdidas económicas.

En ese nuevo contexto, el uso de bioinsumos amigables al ambiente, aparece como una opción viable y aplicable, siendo una línea de productos de origen biológico, utilizados con fines de nutrición vegetal, manejo integrado de plagas y enfermedades, es el caso de biofertilizantes y bioplaguicidas; dentro el primer grupo, es necesario aislar, seleccionar y formular biofertilizantes nitrogenados. Para cumplir ese propósito, en el presente trabajo se seleccionaron las mejores cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno disponibles para el cultivo de quinua, y así incrementar los rendimientos, a la vez de preservar el medio ambiente.

## **Materiales y métodos**

La investigación en laboratorio e invernadero se realizó en los ambientes de la Fundación PROINPA, el año 2016, en Cochabamba.

En una primera etapa se reactivaron 21 cepas bacterianas, relacionadas con la fijación de nitrógeno, procedentes de quinua y papa nativa, del cepario de PROINPA.

Para la determinación de bacterias fijadoras de nitrógeno, se preparó el medio Burk sólido (medio de cultivo selectivo) y el medio NFB (medio de cultivo diferencial). En ambos medios se sembraron los 21 aislados bacterianos, para determinar si eran fijadores de nitrógeno. Así se seleccionaron aquellas cepas que presentaban desarrollo y crecimiento en el medio selectivo Burk, y a la vez presentaban viraje en 2 o 3 grados y crecimiento en el medio diferencial NFB. Las cepas que manifestaron desarrollo y crecimiento en ambos medios fueron las que se seleccionaron para avanzar en el trabajo.

La segunda etapa se realizó en invernadero, utilizando un diseño experimental de Bloques Completos al Azar. Se establecieron 24 tratamientos, de los cuales 8 correspondían a las bacterias provenientes del cepario de PROINPA, considerando además a productos comerciales como control positivo (Azozim, DIMAZOS y Graminante). Cada uno de estos insumos, a su vez, se combinó con urea, un control con urea y un control en blanco, que no contenía nada. Para la siembra se utilizaron macetas de 2 kg de capacidad, con sustrato de 1:1:1/2 (arena, lama, y materia orgánica), donde se sembraron 10 semillas por maceta.

En laboratorio se preparó el inóculo con cada una de las cepas seleccionadas como fijadoras de nitrógeno, esto se estandarizó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, para lo cual, 48 horas antes, se realizó la siembra del inóculo activado en medio TSA sólido y se realizó el conteo de las UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

Ocho días después de la siembra, se inoculó un mililitro de solución bacteriana al suelo, cerca al cuello de las plántulas.

Después de 15 días de la inoculación, se procedió a realizar el raleo de las plantas para dejar una sola por maceta, la cual se evaluó hasta la cosecha.

Para la incorporación de la urea se utilizó la fórmula 80-00-00, lo que equivaldría a 174 kg/ha de urea al inicio de la floración (Mujica *et al.* 2004).

En invernadero, se evaluaron las siguientes variables de respuesta: rendimiento de grano, altura de planta, longitud y diámetro de panoja, longitud, peso y volumen de raíz. En laboratorio, se evaluó el número de UFC/gramo de suelo de la rizosfera de las plantas de quinua, al momento de realizar la cosecha.

El análisis estadístico, se realizó en base al PROC MIXED del paquete estadístico SAS<sup>®</sup>. El análisis estadístico para la evaluación de *Bacillus* totales en la rizosfera de las plantas de quinua, se ajustó a una distribución de Poisson, éstos datos fueron analizados bajo la teoría de modelos lineales generalizados con el PROC GENMOD del SAS<sup>®</sup>, además, con toda la información, se realizó el análisis CLUSTER con las medias de cada variable, de esta manera se identificaron las cepas bacterianas con medias similares, de acuerdo al método de Distancia Media.

Durante cinco meses de ensayo en invernadero, se observó el desarrollo vegetativo de las plantas de quinua de la variedad *Jacha Grano*.

## Resultados y discusión

**Bacterias fijadoras de nitrógeno.** De las 21 cepas consideradas, para la investigación, según el método utilizado, se identificaron 8 cepas bacterianas positivas para

la fijación de nitrógeno, estas fueron: **101J** (no identificada), **102J** (no identificada), **103J** (no identificada), **10M hoja** (*Bacillus atrophaeus*), **2A** (*Paenibacillus* sp.), **2C** (*Paenibacillus* sp.), **BV54** (*Paenibacillus polymyxa*) y **BV39** (*Bacillus megasterium*), esta primera selección se basó en el desarrollo de la colonia en el medio Burk y NFB.

El medio Burk, tiene la característica de no contener fuente nitrogenada, de manera que las bacterias que se desarrollan bajo este medio, tienen la capacidad de reducir el nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) para producir NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (amonio), que sirve para la biosíntesis de aminoácidos (Dion y Magallon 2009). Por otro lado, el medio de cultivo diferencial NFB, es usado frecuentemente para evaluar la actividad reductora de acetileno, como indicativo de la fijación de nitrógeno, así, cuando viran del indicador azul de bromotimol, son considerados tentativamente como positivos para el aislamiento en cultivo puro de la bacteria (Cárdenas *et al.* 2010).

**Pruebas de catalasa e hidróxido de potasio.** Todas las cepas fueron positivas, excepto la **101J** (no identificada). Esto significa que los microorganismos poseen la enzima catalasa, que actúa descomponiendo el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, lo cual se observó mediante desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno (Pérez y Aquiahuatl 2004). Las bacterias que viven en ambientes aeróbicos requieren de catalasa para convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para la célula bacteriana.

Koneman (2001), afirma que dentro del género *Bacillus* spp., existen bacterias anaerobias y aerobias facultativas y la mayoría son catalasa positivas.

Con la aplicación de KOH sobre la muestra de cepas bacterianas, se observó la formación de una suspensión sumamente viscosa que al levantarla con una asa, formó un hilo de aspecto mucilaginoso; esta reacción positiva ocurre en bacterias Gram positivas, esta prueba es para determinar la morfología de las bacterias Huang (1991), este tipo de reacción se presentó en las cepas **2A** (*Paenibacillus* sp.), **2C** (*Paenibacillus* sp.), **BV54** (*Paenibacillus polymyxa*.) y **102J**, no así en las cepas **10M hoja** (*Bacillus atrophaeus*), **BV39** (*Bacillus megasterium*), **101J** y **103J** que son negativas. Es decir que las cepas que dieron positivo son bacilares.

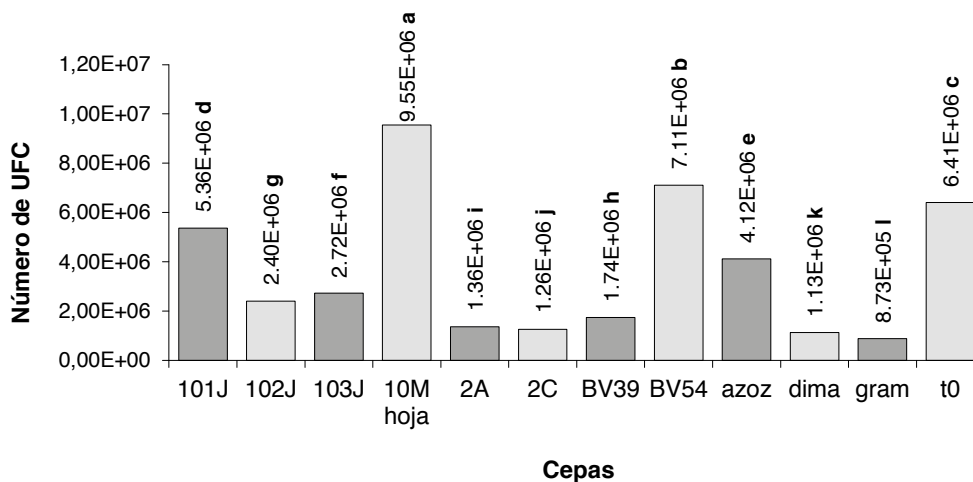
**Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. totales, en la rizosfera de las plantas de quinua.** De acuerdo al análisis de varianza, para las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la rizosfera, se reportaron diferencias estadísticamente significativas entre cepas.

Así también se observó diferencias en la interacción de 174 kg/ha de urea más cepas.

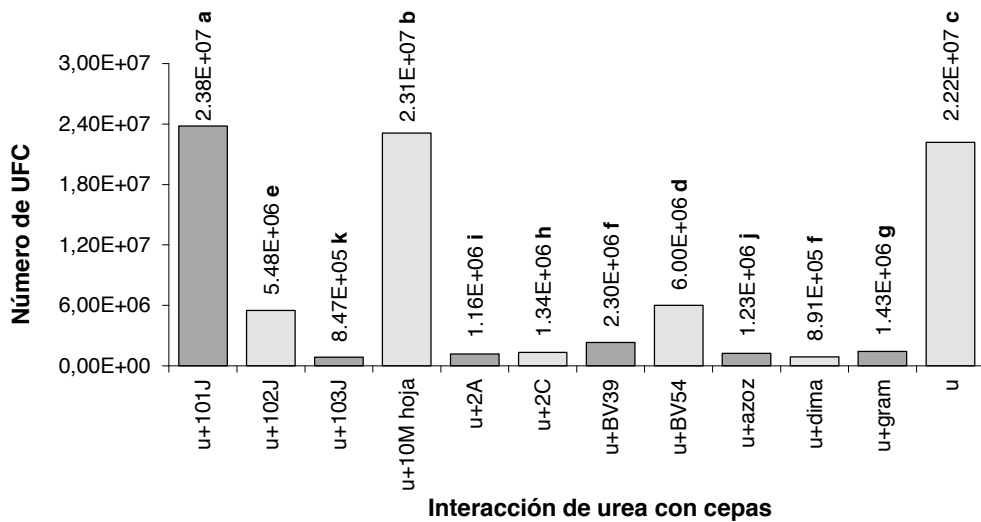
Se observó que el número de UFC encontrados en la rizosfera de todos los tratamientos, estaban presentes en un rango de  $10^5$  UFC, donde los tratamientos, **103J**, **BV54** y **Azozim**, mostraron poblaciones relativamente más altas (Figura 1) que el **t0**, al igual que la interacción **U+101J**, que tuvo un número de UFC relativamente mayor que el testigo positivo **urea** (Figura 2).

Bais *et al.* (2006), consideran que una rizosfera alta en bacterias, se da cuando en el suelo hay un número de  $10^7$  y  $10^8$  UFC/g, mientras que las densidades de población en el rizoplano, van desde  $10^5$  hasta  $10^7$  UFC/g.

En el caso del presente estudio, las muestras de suelo rizosférico pasaron por un shock térmico, esto para destruir las células vegetativas de bacterias que no eran *Bacillus*, por lo que solo se cuantificaron aquellas que formaron endosporas.



**Figura 1.** Número de UFC en la rizosfera de plantas de quinua inoculadas con cepas



**Figura 2.** Número de UFC en la rizosfera de plantas de quinua inoculadas con las cepas y combinadas con 174 kg/ha de urea

En otros trabajos se observó que la inoculación de bacterias exógenas, puede modificar poblaciones de microorganismos nativos, y de la misma forma, un inoculante (bacterias) puede ser afectado por ellos, así como por las condiciones edáficas (humedad) y climáticas (temperatura), que tienen un efecto directo sobre los microorganismos (Benitez 2013), por lo tanto las bacterias nativas del suelo, pueden tener un efecto (positivo o negativo) o ningún efecto sobre la eficacia de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Castro-Sowinski *et al.* 2007).

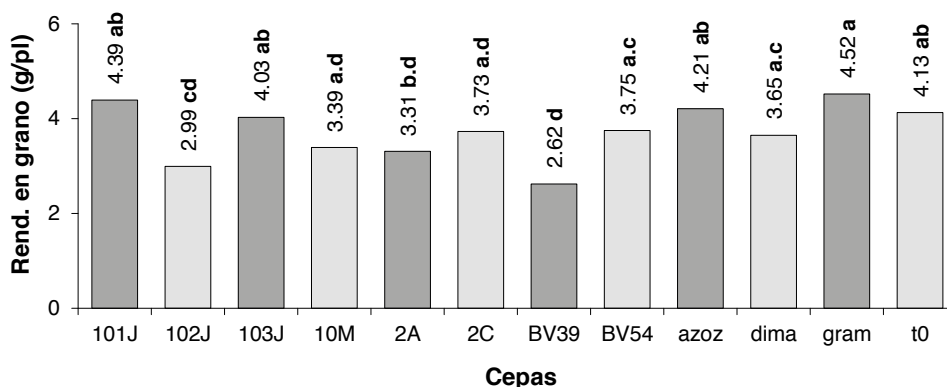
**Rendimiento en grano de quinua cultivada en invernadero.** De acuerdo al análisis de varianza, para la variable rendimiento de grano (g/planta), no se reportaron diferencias significativas entre la interacción de urea con cepas ( $Pr=0,1894$ ). Entre cepas sí se observó diferencias significativas ( $Pr = 0.0001$ ).

Las plantas inoculadas con las cepas **101J**, **103J**, **BV54** y los productos comerciales **Graminante** y **Azozim**, mostraron un rendimiento mayor que el testi-

go (**t0**), solo **Graminante** se mostró estadísticamente mejor que el **t0** (Figura 3).

Benitez (2013), observó que la inoculación por sí sola, con la cepa *Paenibacillus polymyxa*, aumentó el peso de la semillas en maíz en un 18.5%, y al complementarla con una dosis de nitrógeno (90 kg/ha), el peso se incrementó en 32%, en contraste, cuando se aumentó la dosis de fertilizante a 180 kg/ha, la respuesta disminuyó. Esta tendencia concuerda con los resultados obtenidos por Adesamoye *et al.* (2009), quienes encontraron que a dosis bajas de fertilización química, en combinación con la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, las plantas presentaron mayor altura, mayor peso seco y mayor rendimiento, pero cuando la dosis de fertilizante se incrementa, observaron que el efecto de la inoculación disminuye.

Los resultados logrados en el presente trabajo, indican que el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Paenibacillus* spp. o *Azospirillum* spp., aumentan el rendimiento.



**Figura 3.** Efecto de las cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno, sobre el rendimiento (g/planta) de las plantas de quinua en invernadero

Es el caso de la cepa **101J**, la cual supera con un 6% más que el **t0**, sin inoculante, o *Azospirillum* spp. como es el caso del **Graminante** que contiene *Azospirillum* y aumenta en un 8.6% el rendimiento a comparación del **t0**.

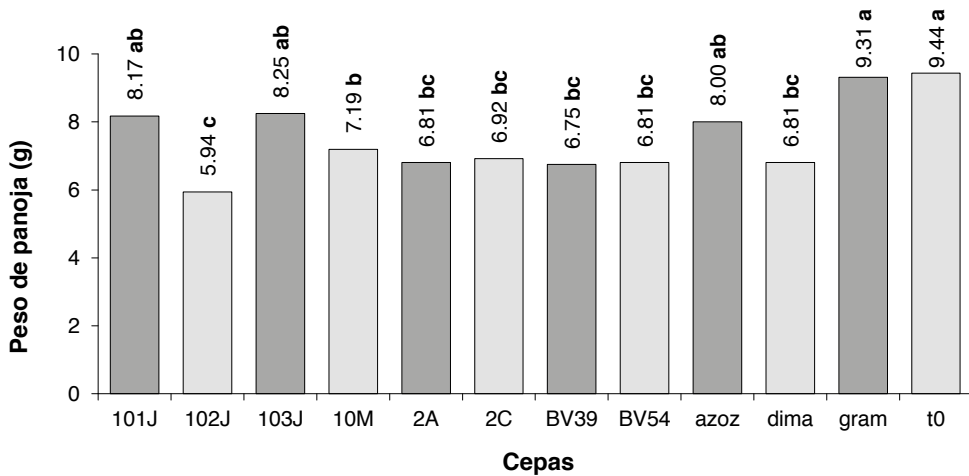
La interacción de urea con cepas no mostró diferencias estadísticamente significativas, al igual que los resultados que encontró Benitez (2013), esto puede deberse a que se utilizó una dosis muy elevada de nitrógeno, la cual inactiva la acción de la enzima nitrogenasa, debido a que la fijación biológica de nitrógeno, requiere de un alto costo energético y conlleva a los microorganismos a inactivar la enzima nitrogenasa, cuando está disponible el nitrógeno combinado, evitando un gasto energético innecesario en correspondencia con el principio de economía celular (Baldani *et al.* 2014).

**Peso de panoja.** En la variable peso de panoja, se reportó diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ( $Pr = 0,0001$ ), pero no hubo interacción entre la urea con las cepas ( $Pr = 0,599$ ).

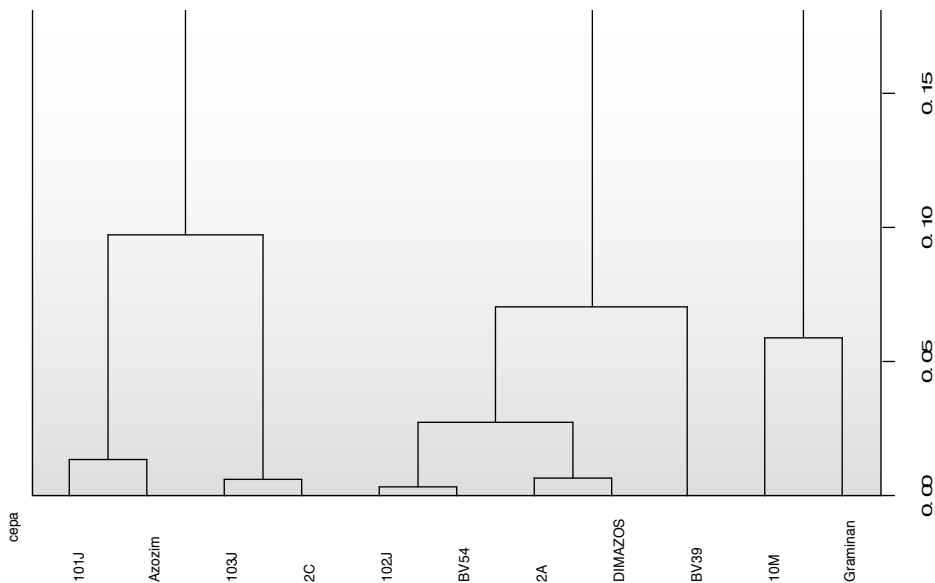
La Figura 4 muestra que para esta variable, ninguna de las cepas fue estadísticamente mejor que el testigo.

Adesamoye *et al.* (2009), encontraron que las plantas con dosis bajas de fertilizante mineral, en combinación con la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, presentaron mayor rendimiento, pero cuando la dosis de fertilizante se incrementó, se obtiene menor respuesta a la inoculación con las bacterias indicadas.

**Análisis clúster de 11 cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno.** A través del análisis de clúster, las 11 cepas bacterianas seleccionadas, se agruparon en tres grupos principales (Figura 5), donde el primer grupo está formado por las cepas **101J**, **Azozim**, **103J** y **2C**, que se caracterizan por tener mayor rendimiento de grano, peso y longitud de panoja, longitud de raíz y altura de planta. El segundo grupo se caracteriza por tener mayor peso de y volumen de raíz. El tercer grupo no presenta ninguna característica superior que destaque frente a los grupos uno y dos.



**Figura 4.** Efecto de las cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno sin combinar con urea, sobre el peso de panoja en plantas de quinua



**Figura 5.** Agrupamiento de 11 cepas a través de 8 variables cuantitativas

## Conclusiones

- Se lograron activar con éxito 21 cepas provenientes de la Fundación PROINPA.
- De las 21 cepas, después de someterlas a la prueba de fijación de nitrógeno, 8 fueron seleccionadas con tal fin, las

cuales son: **101J** (no identificada), **102J** (no identificada), **103J** (no identificada), **10M hoja** (*Bacillus atrophaeus*), **2A** (*Paenibacillus* sp.), **2C** (*Paenibacillus* sp.), **BV54** (*Paenibacillus polymyxa*.) y **BV39** (*Bacillus megasterium*).

- Según las pruebas bioquímicas, las cepas **101J**, **103J**, **10M hoja**, **BV54**, son *Gram Positivas*. Para la prueba de catalasa, las cepas **102J**, **103J**, **10M hoja**, **BV39**, **BV54**, **2A** y **2C**, dieron positivo, es decir que éstas son las que poseen la enzima catalasa, por lo tanto son bacterias aeróbicas.
- En invernadero, en plantas de quinua, las cepas seleccionadas como las mejores fueron **101J** (no identificada), **103J** (no identificada) y **2C** (*Paenibacillus* sp.).

## Referencias citadas

- Adesamoye A., Torbert H., Kleopfer J. 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbiology Ecology*. 58: 921-929.
- Bais P., Weir T., Perry G., Gilroy S., Vivanco J. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 233-266.
- Baldani J., Massena S., Boodey L. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*. 384: 413-431.
- Benitez M. 2013. Inoculación con *Paenibacillus polymyxa* y fertilización nitrogenada en maíz bajo condiciones de temporal. Tesis MSc. Colegio de Pos Graduados. Montecillo, Texcoco. México. 89 p.
- Cárdenas D., Garrido M., Bonilla R., Baldani L. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Laboratorio de Microbiología de Suelos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Bogotá, Colombia.
- Castro-Sowinski S., Herschkoviz Y., Okon Y., Eurkevitch J. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting Rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 276: 1-11.
- Dion P., Magallon C. 2009. Curso práctico teórico de microbiología agrícola. Importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Bolivia. PRO-INPA. Cochabamba, Bolivia 66 p.
- Huang J. 1991. The structure of bacterial penetration in plants. *Annual review of phytopathology*. 24: 141-157.
- Koneman W. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Mujica A., Izquierdo J., Marathe J. 2004. Quinua ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro. Origen y distribución de la Quinua. Cap. I. Santiago, Chile. pp. 1 - 24.
- Pérez M., Aquihuatl M. 2004. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp. 18-24.
- Toledo L. 2013. Selección de bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) del género *Bacillus* sp. aisladas de plantas de quinua para el desarrollo de biofertilizantes. Tesis de grado. UMSS. FCAYP. Cochabamba, Bolivia. 60 p.

*Agradecimientos: Los Autores agradecen el financiamiento de la investigación al BID-CABOLQUI a través de la Fundación PROINPA*

*Trabajo recibido el 1 de junio de 2017 - Trabajo aceptado el 8 de septiembre de 2017*