

Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia

Evaluation of inoculation with asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms isolated from rhizosphere of *Pinus patula* in Colombia

Cielo Orozco-Jaramillo^a, Patricia Martínez-Nieto^{a*}

*Autor de correspondencia: ^aInstituto Nacional de Los Recursos Naturales Renovables y del Medio Ambiente (INDERENA) e Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt, Estación Forestal La Florida, Cota (Cundinamarca, Colombia), patingli@yahoo.com

SUMMARY

The effects on different vegetal parameters of asymbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of *Pinus patula* were studied under greenhouse conditions, in experiments designed for statistical analysis using these forest specie seedlings. This research also examined the interactions of ectomycorrhizal fungus *Suillus luteus* and the microorganism isolates in *P. patula*, as well as the nitrogenase activity in these bacteria by acetylene reduction assay. The free nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus macerans*, *Enterobacter agglomerans* and *Pseudomonas* sp., were isolated of the rhizosphere of *P. patula*. Their maximum acetylene-reducing values were 120, 18.7, 100, 120 nmol ethylene/tube respectively. Results showed that the best plant growth and nitrogen uptake in the in vivo test in *P. patula* with these microorganisms and *S. luteus* were observed with *A. chroococcum*. According to the longitudinal root cuts in the treatments using *S. luteus* with *A. chroococcum*, *B. macerans*, *E. agglomerans*, or *Pseudomonas* sp., the fungus with the agglutinated bacteria was showed around the mycorrhizal root surface only in the *S. luteus* and *B. macerans* treatment, but the mycorrhizal infection percentage was low. The inoculation with nitrogen fixing bacteria stimulated longitudinal growth and nitrogenous nutrition of *P. patula*.

Key words: asymbiotic, ectomycorrhizas, nitrogen-fixation.

RESUMEN

El efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas aisladas de la rizósfera de *Pinus patula* sobre diferentes parámetros vegetales fue estudiado bajo condiciones de invernadero, usando plántulas de esta especie forestal. Esta investigación también examinó la interacción entre el hongo ectomicorrízico *Suillus luteus* y los microorganismos aislados en *P. patula*, así como la actividad de la nitrogenasa por el ensayo de reducción de acetileno. De la rizósfera de *P. patula* se aislaron las bacterias fijadoras libres de nitrógeno *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus macerans*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas* sp. Los valores máximos de reducción de acetileno presentados por estas bacterias fueron 120, 18, 7, 100, 120 nmol etileno/tubo, respectivamente. Los resultados en el ensayo in vivo de *P. patula* con estos microorganismos y *S. luteus* mostraron que el mejor crecimiento de las plantas y la captación de nitrógeno se observaron con *A. chroococcum*. Al observar los cortes longitudinales de raíz de los tratamientos usando *S. luteus* con las diferentes bacterias (*A. chroococcum*, *B. macerans*, *E. agglomerans* y *Pseudomonas* sp.) sólo el tratamiento con *S. luteus* y *B. macerans* presentó el hongo con bacterias aglutinadas alrededor de la superficie de la raíz micorrizada, pero el porcentaje de micorrización fue bajo. La inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno estimuló el crecimiento longitudinal y la nutrición nitrogenada de *P. patula*.

Palabras clave: asimbiótico, ectomicorrizas, fijación de nitrógeno.

INTRODUCCIÓN

El proceso de fijación de nitrógeno es importante en los ecosistemas forestales, fijando al año entre 0,5-5 kg ha⁻¹ (Fisher y Binkley 2000). Los microorganismos que llevan a cabo este proceso representan aproximadamente el 5% de la población bacteriana total y se encuentran en la superficie de varios órganos de los árboles, tejidos radiculares y foliares, suelo y tubérculos de ectomicorri-

zas (Chanway 1999, Rösch *et al.* 2002, Paul *et al.* 2007). Además, estas bacterias al ser usadas en la regeneración artificial de bosques, incrementan el desarrollo de plántulas de diferentes especies de coníferas (Chanway 1997).

En Colombia existen cerca de 150.000 hectáreas de bosques productivos, plantados principalmente en la región andina y amazónica, donde un 70% son especies forestales introducidas como teca (*Tectona grandis* L. F), araucaria (*Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch.), urapán (*Fraxinus*

chinensis Roxb.), ciprés (*Cupressus lusitanica* Mill.) y diversos pinos (*Pinus spp.* L.) (Varón 1999, Presidencia de la República de Colombia 2005). Estas plantaciones comerciales se ubican generalmente en tierras agrícolas abandonadas y de fertilidad baja (DAMA y Corporación Suna Hisca 2003), generando varios inconvenientes desde las fases iniciales de crecimiento, entre los que se encuentran problemas en fertilización nitrogenada y fosfatada, bajo porcentaje de micorrización y desarrollo de enfermedades (León *et al.* 1993).

Los bosques de *Pinus patula* Schlecht *et* Cham se localizan en altitudes por encima de 1.800 m snm, principalmente sobre suelos de cenizas volcánicas que se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno y fósforo, además de mostrar una población bacteriana menor en comparación con suelos con coberturas agrícolas (Villegas 2004). Industrialmente su madera es muy apreciada y se utiliza en algunas construcciones campestres, postes para el servicio público en zonas rurales, durmientes, pilotes, vigas, columnas, pulpa para papel, madera aserrada, cajas y empaques (León *et al.* 1993, González-Rubio 2004).

Publicaciones colombianas referentes a bacterias nativas fijadoras asimbióticas de nitrógeno diferentes a *Azospirillum* y *Azotobacter* en especies forestales son limitadas, lo mismo que estudios sobre interacciones tripartitas entre hongos ectomicorrízicos, bacterias fijadoras de nitrógeno y forestales. Se han aislado las bacterias diazotróficas *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter gergoviae* de las especies forestales nativas cedro rosado (*Cedrela montana* Turczaninow), pino romeron (*Nageia rospigliosii* Pilger Laubenfels), encenillo (*Weinmannia tomentosa* L.f) y pagoda (*Escallonia myrtilloides* L.f) (Deaza y Mesa 1996, Jiménez 1996, Parra 1996, Martínez-Nieto y García-González 2002). La demostración de interacciones entre microorganismos fijadores de nitrógeno con micorrizas es un aporte importante para la industria forestal, debido a que las plantaciones de coníferas se realizan en su mayoría en suelos de baja fertilidad. Por esta razón, el propósito de este estudio es determinar el efecto de microorganismos fijadores asimbióticos de nitrógeno aislados de *P. patula* sobre diferentes parámetros vegetales en esta especie forestal. Además determinar en *P. patula* el efecto de coinoculación del hongo ectomicorrízico *S. luteus* y bacterias diazotróficas.

MÉTODOS

Selección de sitios y toma de muestras. Se seleccionaron cinco zonas de plantaciones representativas de *P. patula* localizadas en el municipio de Cota (Cundinamarca, Colombia).

Las muestras se tomaron por triplicado de la rizósfera de 15 árboles por plantación forestal, siguiendo las normas recomendadas por Novo (1993).

Cultivo, aislamiento e identificación. Se sembró un gramo de suelo en caldos libres de nitrógeno (malato o glucosa como fuente de carbono) y en medios enriquecidos para *Azotobacter sp.* (caldo Asbhy, Lipman y Jensen). Los cultivos se incubaron en atmósfera aeróbica a 30° C (Novo 1993). Después de detectado crecimiento se inocularon en los respectivos medios sólidos durante 48 horas. De acuerdo con la morfología colonial y microscópica se repicaron en agar nutritivo, agar Mac Conkey, agar semisólido malato libre de nitrógeno (NFs) y Asbhy. Una vez purificados se procedió a la caracterización de estos aislamientos mediante pruebas bioquímicas específicas (Holt *et al.* 1994).

Ensayo in vivo de fijadores de nitrógeno. Este ensayo se distribuyó en un diseño completo al azar, con once tratamientos, tres repeticiones y cinco unidades experimentales por repetición (cuadro 1). Las variables evaluadas fueron: altura, número de hojas, biomasa aérea, biomasa radicular, contenido de nitrógeno del suelo y foliar. Las raíces de plántulas entre 4-6 cm de *P. patula* fueron sumergidas en 5 mL de la suspensión bacteriana o micelial de acuerdo al experimento y transferidas a 175 bolsas plásticas que contenían suelo estéril-arena (1:1). Posteriormente se procedió a inocular la tierra con 10 mL de la suspensión bacteriana según tratamiento (Fujii *et al.* 1987, Orozco 1989). El experimento se mantuvo bajo condiciones de invernadero por un año con una temperatura promedio de 24° C, humedad de rocío y buena penetración de luz. Se utilizó un suelo de textura franca, pH ácido (5,6) y un contenido de materia orgánica de 7,5%.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en el diseño experimental completo al azar.

Treatments used in the fully randomized experimental design.

Tratamiento	Descripción
1	<i>Pseudomonas sp.</i>
2	<i>Bacillus macerans</i>
3	<i>Enterobacter agglomerans</i>
4	<i>Suillus luteus</i>
5	<i>S. luteus</i> + <i>Pseudomonas sp.</i>
6	<i>S. luteus</i> + <i>B. macerans</i>
7	<i>S. luteus</i> + <i>E. agglomerans</i>
8	<i>S. luteus</i> + <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>B. macerans</i> , <i>E. agglomerans</i> y <i>Azotobacter chroococcum</i>
9	<i>A. chroococcum</i>
10	Suelo no inoculado
11	<i>S. luteus</i> + <i>A. chroococcum</i>

El inóculo del hongo *S. luteus* se preparó de acuerdo con la metodología descrita por Orozco (1989) y los microbianos se obtuvieron a partir de cultivos puros de las cinco bacterias diazotróficas aisladas, a una concentración equivalente a 5 x 10⁸ UFC/mL (Fujii *et al.* 1987).

Porcentaje de micorrización. La preparación y lectura de los cortes longitudinales de las raíces de los tratamientos donde se inoculó el hongo *S. luteus* se hizo siguiendo la metodología de Alvarado (1989) y Orozco (1989). Los segmentos de raíces de 0,5 cm de longitud fueron coloreados con azul de tripano en lactofenol y se observaron al microscopio en 40 X, dividiendo la lectura en cuatro campos equivalentes al 100%.

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron evaluados por análisis de varianza de una sola vía. La diferencia entre tratamientos se hizo mediante la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0,01$).

Actividad de la nitrogenasa. La actividad del complejo enzimático nitrogenasa se midió cada tres horas a presión atmosférica, por el ensayo de reducción de acetileno (ARA) en medio NFs, durante 30 horas. La producción de etileno se midió por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID) y con nitrógeno como gas de arrastre, de acuerdo con la metodología estandarizada en el laboratorio de Recursos Biofísicos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. La actividad de reducción de acetileno se registró contra el número de fijadores de nitrógeno calculado en UFC/mL.

RESULTADOS

Cultivo, aislamiento e identificación. De un total de 151 cepas de bacterias aerobias aisladas de la rizósfera de *P. patula*, se recuperaron 62 cepas fijadoras de nitrógeno. Las pruebas bioquímicas sugieren que las bacterias

diazotróficas son cercanas a las especies *B. macerans* (35,5%), *Pseudomonas sp.* (29%), *E. agglomerans* (22,6%) y *A. chroococcum* (12,9%).

Ensayo in vivo de fijadores de nitrógeno. Las plántulas inoculadas con *A. chroococcum* presentaron los mejores promedios en casi todos los parámetros vegetales, a excepción del peso seco radicular, y de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan no hubo diferencias significativas con algunos tratamientos microbianos ($P > 0,01$) (cuadro 2). Además, los resultados muestran incrementos en la captación de nitrógeno y baja pérdida de este elemento en el suelo en las plántulas inoculadas con bacterias en comparación con las no inoculadas.

Porcentaje de micorrización. La mayor micorrización se obtuvo con los tratamientos *S. luteus* (30%) y *S. luteus* con *Azotobacter* (26,7%), no encontrando diferencias significativas entre ellos, según la prueba de rango múltiple de Duncan (cuadro 2). En el caso de *B. macerans* con el hongo ectomicorrízico se observó un porcentaje de micorrización de 8,3% y en los demás tratamientos con *S. luteus* no se encontró colonización micorrizal.

Los grados de infección en los tratamientos donde se encontró colonización por el hongo se pueden considerar moderados (entre 20-50%) para *S. luteus* y *S. luteus* con *Azotobacter* y bajos para *B. macerans* y *S. luteus* (entre 1-20%).

En los cortes longitudinales de las raíces del tratamiento con *S. luteus* y *A. chroococcum* sólo se observó el hongo ectomicorrízico. La observación microscópica de cortes longitudinales de raíz del tratamiento con *Pseudomonas sp.* y *S. luteus* mostró bacilos aglutinados

Cuadro 2. Evaluación de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre diferentes parámetros vegetales en *P. patula*.

Evaluation of inoculation with nitrogen-fixing bacteria on different plant parameters in *P. patula*.

Tratamientos	Parámetros vegetales					
	Altura plantas** cm	Peso seco foliar** g	Peso seco radicular** g	Contenido de nitrógeno foliar** g/planta	Contenido de nitrógeno en suelo** g/cm ³	Porcentaje de micorrización** %
<i>Pseudomonas sp.</i>	15,1abc	22,9d	6,7d	0,38b	1,56ab	–
<i>B. macerans</i>	18,6a	26,2c	18,6b	0,40b	1,22e	–
<i>E. agglomerans</i>	17,2ab	30,9b	22,9a	0,43b	1,33de	–
<i>S. luteus</i>	15,3abc	29,5b	11,6d	0,37b	1,43bcd	30a
<i>S. luteus</i> + <i>Pseudomonas sp.</i>	15,6abc	26,1c	6,9d	0,43b	1,48bc	0c
<i>S. luteus</i> + <i>B. macerans</i>	7,3e	4,6g	4,3e	0,07d	1,37cd	8,3b
<i>S. luteus</i> + <i>E. agglomerans</i>	8,9de	5,6g	4,4e	0,08d	1,09f	0c
<i>S. luteus</i> + Mezcla bacterias	12,1cd	9,1f	4,9e	0,16d	1,46bcd	0c
<i>A. chroococcum</i>	18,7a	37,4a	16,6c	0,72a	1,64a	–
Suelo no inoculado	10,0de	10,5f	6,4d	0,13d	0,98f	–
<i>A. chroococcum</i> + <i>S. luteus</i>	14,5bc	17,6e	22,3a	0,23c	1,07f	26,7a

** $P < 0,01$. Los datos representan los promedios de las tres réplicas. Las letras indican los niveles de la prueba de rango múltiple de Duncan, donde letras iguales indican promedios estadísticamente iguales. El primer nivel está representado por la letra a.

alrededor de la raíz pero no se encontró la presencia del hongo *S. luteus*. Lo mismo ocurrió con *E. agglomerans*, pero en este caso no se presentó aglutinación bacteriana; mientras que en el tratamiento con *B. macerans* y el hongo, los dos estuvieron presentes y la bacteria aglutinada alrededor de la raíz.

Ensayo de la nitrogenasa. En el ensayo realizado cada tres horas se pudieron ver comportamientos diferentes en las bacterias fijadoras de nitrógeno. *Bacillus macerans*, *E. agglomerans* y *A. chroococcum* presentaron la mayor actividad a las tres horas de incubación con acetileno,

Pseudomonas sp. a las 24 horas y la mezcla a las 15 horas. *Bacillus macerans* presentó dos picos de gran actividad a las 3 y 18 horas. La actividad de la enzima varió entre 0-18,7 nmol etileno/tubo para *Pseudomonas sp.*, de 0-120 nmol/tubo en *B. macerans*, 0-110 nmol/tubo en *E. agglomerans*, de 0-120 nmol/tubo en *A. chroococcum* y en la mezcla de 0-99,8 nmol etileno/tubo (figura 1).

El comportamiento de la biomasa microbiana durante la incubación con acetileno no presentó un crecimiento apreciable a excepción de *A. chroococcum* y la mezcla de bacterias donde hay una más o menos definida fase logarítmica (figura 2).

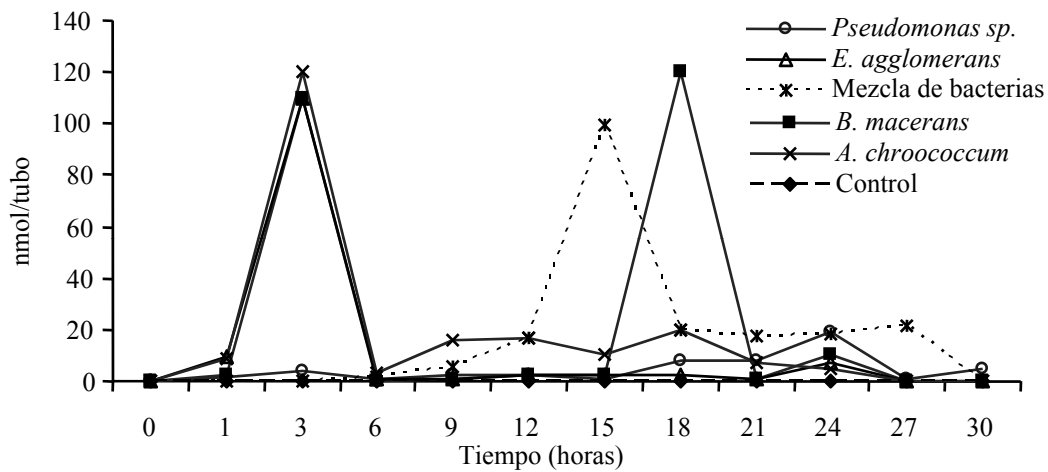


Figura 1. Ensayo de reducción de acetileno a las bacterias utilizadas en el ensayo *in vivo*.
 Acetylene reduction assay to bacteria used in the *in vivo* test.

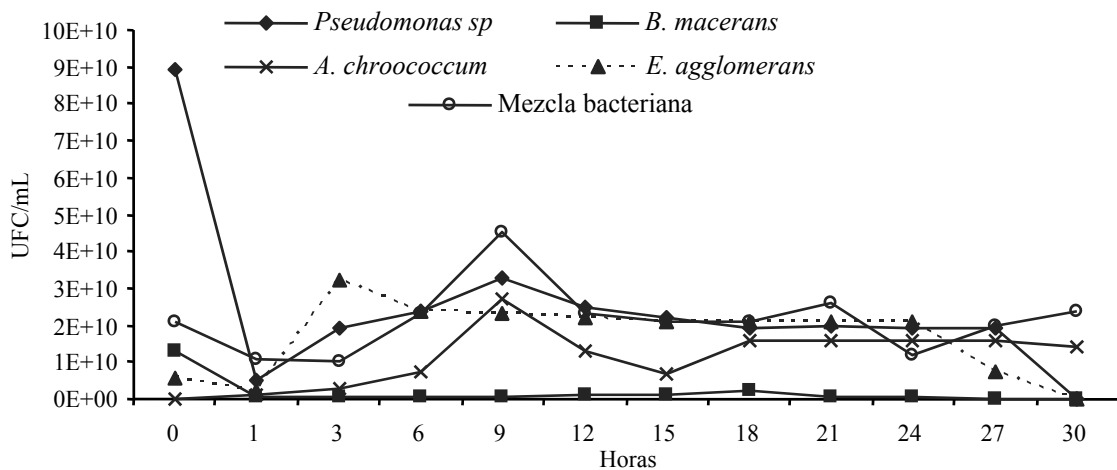


Figura 2. Crecimiento microbiano presentado durante la incubación en atmósfera de acetileno.
 Microbial growth during incubation in acetylene atmosphere.

DISCUSIÓN

Cultivo, aislamiento e identificación. Algunas de las bacterias aisladas en este estudio también se han aislado en Colombia en árboles nativos. Especies bacterianas de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Klebsiella* y *Arthrobacter* se han aislado en Colombia de las especies nativas forestales pino romeron, cedro rosado, encenillo y pagoda (Deaza y Mesa 1996, Jiménez 1996, Parra 1996, Martínez-Nieto y García-González 2002). Aunque menos abundantes, las especies diazotróficas pertenecientes al género *Pseudomonas* han sido aisladas en el interior de tejidos radiculares de coníferas, en la rizósfera del pino Paraná (*Araucaria angustifolia* Kuntze), especie forestal en vías de extinción en Brasil, o en pilas de compost a partir de lodos provenientes de fábricas de papel (Chanway 1999, Beauchamp *et al.* 2006, Neroni y Cardoso 2007).

Ensayo in vivo de fijadores de nitrógeno. Los incrementos en la captación de nitrógeno y baja pérdida de este elemento en el suelo por las plántulas inoculadas con bacterias en comparación con las no inoculadas es un hallazgo importante si se tiene en cuenta que uno de los indicadores para determinar la calidad del suelo es el flujo de nitrógeno a través de la biomasa microbiana, determinando que la mayor eficiencia de un suelo o práctica agrícola está dada por el mayor porcentaje de nitrógeno mineralizado que es absorbido por la planta (Yakovchenko *et al.* 1996). Por otro lado, no todos los estudios reportan efectos positivos en el crecimiento vegetal al inocular bacterias fijadoras de nitrógeno o promotoras de crecimiento vegetal (Bashan y Bashan 2005, Saeed *et al.* 2007) como los obtenidos en esta investigación.

El efecto benéfico de la inoculación de fijadores de nitrógeno encontrado en *P. patula* ha sido reportado por varios investigadores en otras coníferas. Estudios realizados utilizando *Azospirillum lipoferum* en plántulas de roble (*Quercus ithaburensis* Dcne.) hallaron un incremento en la nutrición mineral y aumento en la biomasa (Zaady *et al.* 1993). La inoculación de semillas del abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) con *Bacillus polymyxa* aumentó significativamente el peso seco de raíces y brotes de las plántulas de esta conífera (Bashan *et al.* 1996). La inoculación de la especie amazónica utilizada en la producción de muebles, pino chuncho (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), con microorganismos fijadores de nitrógeno y endomicorrizas incrementó la biomasa y la producción de madera (Siviero *et al.* 2008). En Colombia la utilización de *A. lipoferum* estimuló la germinación del cedro rosado y en plántulas de la misma especie la inoculación de esta bacteria junto con *A. chroococcum* produjo incrementos en la mayoría de los parámetros vegetales evaluados (Parra 1996). También se encontraron efectos benéficos con la inoculación de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo en las especies altoandinas *W. tomentosa* y *E. myrtilloides*

con relación a la altura de las plántulas (Martínez-Nieto y García-González 2002).

Por otro lado, se ha encontrado que las asociaciones tripartitas (hongo ectomicorrízico-bacterias asociadas-especie forestal) han resultado beneficiosas en suelos contaminados con metales pesados, ya que estudios recientes han demostrado que la colonización de plántulas del pino albar (*Pinus sylvestris* L.) con hongos ectomicorrízicos específicos y bacterias asociadas a éstos provee protección a la especie forestal contra el efecto de ciertos metales pesados como zinc, cadmio y plomo, siendo promisorio su uso para el establecimiento de plantaciones de coníferas en suelos contaminados con estos metales (Kozdrój *et al.* 2007).

Porcentaje de micorrización. El haber observado solamente en el tratamiento donde se inoculó conjuntamente *B. macerans* y *S. luteus* tanto colonización del hongo como presencia de bacterias aglutinadas en la raíz, concuerda con un estudio realizado con diferentes hongos ectomicorrízicos del género forestal *Picea* (Dietr.), entre los que se encuentra *S. luteus*, en donde encontraron principalmente bacterias Gram-positivas asociadas a la micorrizósfera (Karlifiski *et al.* 2007). Entre los beneficios de esta relación se encuentran el desarrollo de la ectomicorriza y acción antagonica contra hongos patógenos (Hampp y Maier 2004)

Se han reportado varios estudios de bacterias nitrofixadoras libres asociadas a ectomicorrizas en coníferas como pino, abeto y árboles nativos del sudeste asiático pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia* y *Clostridium* principalmente (Duponnois y Garbaye 1991, Kikuchi y Ogawa 1995, Bashan *et al.* 1996). También se ha encontrado actividad de la enzima nitrogenasa en el sistema nodular de la asociación *Suillus tomentosus* / *Pinus contorta* var. *Latifolia* (Paul *et al.* 2007).

Los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con los encontrados por otros investigadores que reportan a *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* sp. como ayudadores de micorrización de ciertas especies fúngicas como, por ejemplo, *Laccaria laccata* en abeto Douglas y *Lactarius rufus* en pino albar (Garbaye 1994, Poole *et al.* 2001, Heinonsalo *et al.* 2004). Sin embargo, es importante resaltar que la colonización bacteriana de las ectomicorrizas muestra cierta especificidad entre el hospedero y el simbiote, pudiendo influenciar positiva o negativamente en la micorrización y por ende en el crecimiento de las plantas (Garbaye 1994, Poole *et al.* 2001). Esta especificidad posiblemente está dada por el efecto combinado del tipo de suelo, el simbiote fúngico, la planta hospedero y la localización de las comunidades asociadas con las ectomicorrizas del árbol (Timonen *et al.* 1999, Kozdrój *et al.* 2007), haciendo entendible por qué no todas las bacterias inoculadas en *P. patula* colonizaron la raíz micorrizada o los diferentes niveles de micorrización encontrados. Por otro lado, Shishido *et al.* (1996) encontraron que diferentes especies de *Bacillus* incrementan el crecimiento longitudinal de las coníferas por mecanismos diferentes a la micorrización.

Ensayo de la nitrogenasa. Hurek *et al.* (1994), trabajando con concentraciones deficientes de oxígeno disuelto con la bacteria fijadora de nitrógeno *Azoarcus sp.*, observaron que se incrementó la tasa específica de respiración y la utilización de la fuente de carbono para la fijación de nitrógeno medida por el ARA, mientras la tasa de crecimiento no mostró cambios significativos. Estos resultados son similares con relación al crecimiento a los reportados en este estudio con las cuatro bacterias diazotróficas evaluadas.

Por otro lado, los hallazgos encontrados en esta investigación concuerdan con lo reportado por David y Fay (1977), los cuales realizaron diferentes ensayos con la prueba de reducción de acetileno, para probar el efecto prolongado de incubación con este gas sobre los microorganismos diazotróficos. Estos autores encontraron en *Azotobacter vinelandii* un declive en el pico de actividad después de tres horas, el cual se recobró parcialmente después de las nueve horas. Esto se debe, posiblemente, a que el acetileno previene la síntesis de amonio cuando permanece por mucho tiempo en el medio a concentraciones suficientes para saturar la nitrogenasa, provocando depleción de nitrógeno en las células. Ello induce a activación y nueva síntesis de la enzima para la fijación de nitrógeno (David y Fay 1977, Staal *et al.* 2001, Kästner y Blöchl 2005). Con base en estos hallazgos y los encontrados en esta investigación no se hace necesario prolongar la incubación con acetileno, principalmente cuando el objetivo es determinar la presencia de la enzima nitrogenasa. Además es una reacción inútil fisiológicamente para los diazotróficos, con gasto de ATP.

La variación de actividad en los microorganismos diazotróficos, además de la inherente a la cepa aislada, también se debe a las condiciones del ensayo de reducción de acetileno, el cual depende de varias condiciones fisicoquímicas, principalmente pH, presión de oxígeno, fuente de carbono y concentración de nitrógeno combinado (Pham y Burgess 1993, Zhang *et al.* 1993, Klassen *et al.* 1997, Limmer y Drake 1998, Beauchamp *et al.* 2006). Dada la gran variabilidad presente en el ensayo de reducción de acetileno, Montoya *et al.* (1996) recomiendan una calibración directa del procedimiento de reducción de acetileno con el protocolo de N¹⁵ para que pueda ser utilizada en la cuantificación de la medida de fijación de nitrógeno y Staal *et al.* (2001) validan el ARA mediante una modificación del ensayo con flujo constante de etileno. Sin embargo, a pesar de estas desventajas esta técnica se sigue utilizando actualmente en diversas investigaciones dada su sensibilidad, bajo costo y rapidez (Beauchamp *et al.* 2006, Paul *et al.* 2007).

CONCLUSIONES

Se observan incrementos en la captación de nitrógeno y estimulación del crecimiento vegetal con la inoculación de la mayoría de bacterias aisladas, indicando el potencial

de estos microorganismos como promotores de crecimiento vegetal y posibles biofertilizantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas”, COLCIENCIAS, INDERENA e Instituto Alexander von Humboldt por la financiación de la investigación; como también a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -CORPOICA-TIBAITATA, laboratorio de Recursos Biofísicos, por prestar sus instalaciones, investigadores y técnicos para la realización de la prueba de reducción de acetileno.

REFERENCIAS

- Alvarado B. 1989. Métodos de propagación e inoculación de *Amanita muscaria* en *Pinus patula* y *Cupressus lusitánica*. In Sieverding E, M Sánchez de Prager y N Bravo ed. Investigación sobre micorrizas en Colombia. Segunda Edición. Palmira, Colombia. Fondo FEN Colombia. p. 188-193.
- Bashan Y, H Levanony, R Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: II bacterias asociativas de la rizósfera. *Terra* 14(1): 159-183.
- Bashan Y, LE de Bashan. 2005. Plant growth promoting. Consultado 20 ene. 2008. Disponible en <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/bacterias.pdf>
- Beauchamp C, G Lévesque, D Prévost, F Chalifour. 2006. Isolation of free-living dinitrogen-fixing bacteria and their activity in compost containing de-inking paper sludge. *Bioresource Technology* 97(8): 1002-1011.
- Chanway CP. 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science* (USA) 43(1): 99-112.
- Chanway CP. 1999. Nitrogen fixing pine? Faculty of Forestry-Newsletter- The University of British Columbia. Consultado 4 may. 2006. Disponible en www.forestry.ubc.ca/brchline/99dec/fs.htm
- David K, P Fay. 1977. Effects of long-term treatment with acetylene on nitrogen-fixing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 34(6): 640-646.
- DAMA (Departamento Administrativo del Medio Ambiente, CO), Corporación Suna Hisca. 2003. Plantaciones exóticas Parque ecológico distrital de montaña Entrenubes. Tomo I. Componente biofísico. Bogotá, Colombia. Consultado 14 jun. 2006. Disponible en http://www.secretariadeambiente.gov.co/sda/libreria/pdf/ecosistemas/areas_protegidas/en_a1.pdf
- Deaza J, C Mesa. 1996. Aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas asociadas a rizósfera de *Nageia rospigliosii* (Pilger Laubenfels). Tesis de grado Bacteriología. Bogota, Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana. 89 p.
- Duponnois R, J Garbaye. 1991. Effect of dual inoculation of Douglas fir with ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in two bare root forest nurseries. *Plant and Soil* 138: 169-176.

- Fisher RF, D Binkley. 2000. Biology of forest soils. Chapter 6. Consultado 5 abr. 2006. Disponible en www.for.nav.edu/courses/hart/for521/fisher%20and%20Binkley%202000/Chapter06.doc
- Fujii I, Y De Huang, A Higoshitani, Y Nishimura, S Iyama, Y Hirota, T Yoneyama, R Dixon. 1987. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria association. *Plant and Soil* 103: 221-226.
- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128: 197-220.
- Hampp R, A Maier. 2004. Interaction between soil bacteria and ectomycorrhiza-forming fungi. *Plant Surface Microbiology*. Consultado 14 mar. 2008. Disponible en <http://www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=20043174749>
- Heinonsalo J, P Frey-Klett, JC Pierrot, L Churin, D Vairelles, J Garbaye. 2004. Fate, tree growth effect and potential impact on soil microbial communities of mycorrhizal and bacterial inoculation in a forest plantation. Consultado 25 mar. 2008. Disponible en http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TC7-49S6RRJ-5&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7fa403d3424efed6bd82e7aa075c5ce0
- Holt J, M Krieg, P Sneath, J Staley, S Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Edition. Baltimore, USA. Williams & Wilkins. 789 p.
- Hurek T, B Reinhold, G Turner, F Bergersen. 1994. Augmented rates of respiration and efficient Nitrogen Fixation at nanomolar concentrations of dissolved O₂ in Hyperinduced *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Journal of Bacteriology* 176 (15): 4726-4733.
- Jiménez A. 1996. Aislamiento y caracterización de diazotróficos microaerofílicos presentes en suelos rizosférico y raíces de *Cedrela montana*. Tesis de grado Bacteriología. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana. 113 p.
- Karlifiski L, S Ravnskov, B Kieliszewska-Rokicka, J Larsen. 2007. Fatty acid composition of various ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas of Norway spruce. *Soil Biology and Biochemistry* 39 (4): 854-866.
- Kästner J, PE Blöchl. 2005. Model for acetylene reduction by nitrogenase derived from density functional theory. *Inorganic Chemistry* 44 (13): 4568-4575.
- Kikuchi J, M Ogawa. 1995. Nitrogen-Fixing (Acetylene Reducing) Activity in the Mycorrhizas of Dipterocarp Seedling. Consultado 31 ene. 2006. Disponible en <http://www.metla.fi/iufro/iufro95abs/d7pap6.htm>
- Klassen G, F Pedrosa, E Souza, S Funayama, L Rigo. 1997. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 887-891.
- Kozdrój J, Z Piotrowska-Seget, P Krupa. 2007. Mycorrhizal fungi and ectomycorrhiza associated bacteria isolated from an industrial desert soil protect pine seedlings against Cd(II) impact. *Ecotoxicology* 16 (6): 449-456. Consultado 14 mar. 2008. Disponible en <http://www.ingentaconnect.com/content/klu/ectx/2007/00000016/00000006/00000149;jsessionid=20831f4tjgjf6.victoria>
- León M, J Ortiz, FA López. 1993. Diagnóstico de daños nutricionales en cuatro especies forestales empleadas en reforestaciones. Instituto Nacional de los Recursos Naturales y del Ambiente, INDERENA-. Antioquia, Colombia. La Imprenta Nacional de Colombia. 88 p.
- Limmer C, HL Drake. 1998. Effects of carbon, nitrogen, and electron acceptor availability on anaerobic N₂-fixation in a beech forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (2): 153-158.
- Martínez- Nieto P, G García-González. 2002. Aislamiento y evaluación preliminar de bacterias rizosféricas diazotróficas y solubilizadoras de fósforo de las especies forestales altoandinas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. Resúmenes Congreso Mundial de Páramos. Boyacá, Colombia. Impreso por Panamericana Formas e Impresos S.A. p 68.
- Montoya J, M Voss, P Kahler, D Capone. 1996. A simple, high-precision, high-sensitivity Tracer Assay for N₂ Fixation. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 986-993.
- Neroni R, E Cardoso. 2007. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. *Scientia Agricola* 64 (3): 303-304.
- Novo R. 1993. Microbiología y química de suelos. Memorias Curso. Bogotá, Colombia. Programa de Educación continuada, Pontificia Universidad Javeriana. 20 p.
- Orozco C. 1989. Selección y cultivos de hongos micorrízicos para *Pinus caribae*. In Sieverding E, M Sánchez de Prager y N Bravo ed. Investigación sobre micorrizas en Colombia. Palmira, Colombia. Segunda Edición. Palmira, Colombia. Fondo FEN Colombia. p. 125-137.
- Parra C. 1996. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo inicial de *Cedrela montana* Turczaninow (Cedro rosado). Tesis de grado Bacteriología. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana. 124 p.
- Paul LR, BK Chapman, CP Chanway. 2007. Nitrogen fixation associated with *Suillus tomentosus* tuberculate ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. latifolia. *Annals of Botany* 99 (6): 1101-1109.
- Pham D, B Burgess. 1993. Nitrogenase Reactivity: Effect of pH on substrate reduction and CO inhibition. *Biochemistry* 32 (49): 13725-13761.
- Poole EJ, GD Bending, JM Whipps. 2001. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytologist* 151 (3): 743-751.
- Presidencia de la República de Colombia. 2005. Cultivos forestales podrían generar 760 mil empleos. Consultado 14 jun. 2006. Disponible en <http://www.presidencia.gov.co/sne/2005/enero/27/052722005.htm>
- Rösch C, A Mergel, H Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8): 3818-3829.
- Saeed B, M Sajjad, A Bano, K Malik. 2007. Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and phytohormone-producing *Enterobacter* strains. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47 (8): 1008-1015.
- Shishido M, HB Massicotte, CP Chanway. 1996. Effect of plant growth promoting *Bacillus* strains on pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection. *Annals of Botany* 77: 433-441.
- Staal M, S Lintel-Hekkert, F Harren, L Stal. 2001. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction

- assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environmental Microbiology* 3 (5): 343-351.
- Siviero M, A Marega, D Dos Santos, R Roselli, S Yun, I Abonizio, L Sayuri, C Castro, M Horta, W Zangaro, M Nogueira, G Andrade. 2008. Interaction among N-fixing bacteria and AM fungi in Amazonian legume tree (*Schizolobium amazonicum*) in field conditions. *Applied Soil Ecology* 39 (2): 144-152.
- Timonen S, K Jorgensen, K Haahtela, R Sen. 1999. Bacterial communities at defined locations of Scots pine mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat. Consultado 31 ene. 2006. Disponible en <http://www.icom2.slu.se/ABSTRACTS/Timonen.html>
- Varón LF. 1999. Reforestación, inversión con buena cosecha. *Revista el Mueble y la Madera* 24: 9-14.
- Villegas JC. 2004. Análisis del conocimiento en la relación agua-suelo-vegetación para el departamento de Antioquia. *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia EIA* 1: 73-79.
- Yakovchenko V, L Sikora, D Kaufman. 1996. A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* 21:245-251.
- Zaady E, A Prerevolotsky, Y Okon. 1993. Promotion of plant growth by inoculums with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry* 25 (7): 819-823.
- Zhang Y, R Burris, P Ludden, G Roberts. 1993. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobic and ammonium in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 175 (21): 6781-6788.

Recibido: 31.03.08

Aceptado: 25.03.09