

# EFFECTO DE LA APLICACIÓN COMBINADA DE *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* Y *BACILLUS MEGATHERIUM* VAR *PHOSPHATICUM* SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLÁNTULAS DE TABACO.

Yarilis León González<sup>1</sup>, Rafael Martínez Viera<sup>2</sup>, Juan Miguel Hernández Martínez<sup>1</sup> y Yoanna Cruz Hernández<sup>1</sup>.

- 1 Estación Experimental del Tabaco. Finca Vivero, San Juan y Martínez, Pinar del Río. C.P. 23200.
- 2 Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Cuba

## RESUMEN.

La utilización de los biofertilizantes constituye una de las alternativas nutricionales más aceptadas dentro del contexto agrícola mundial, sin embargo en la actualidad existe insuficiente experiencia en cuanto a la aplicación de estos en el cultivo del tabaco. Se han realizado estudios en diferentes cultivos incluyendo algunos de la familia a la cual pertenece el tabaco (solanaceae) en los cuales se ha comprobado que los biofertilizantes influyen positivamente, por lo que durante las campañas tabacaleras 2008/2010 se realizó un experimento en la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, Pinar del Río, con el objetivo de conocer el efecto de la aplicación combinada de dos biofertilizantes a base de las bacterias *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* sobre las características morfológicas de las plántulas de tabaco obtenidas en semilleros tecnificados. Se estudiaron 18 tratamientos los cuales se formaron a partir de la combinación de dos niveles de fertilizante nitrogenado (el 100 y el 75 % del fertilizante total), tres niveles de fertilizante fosfórico (el 100, el 75 y el 50 % del total a aplicar), y dos biofertilizantes uno simple a base de *Azotobacter chroococcum* y la mezcla de este con el *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*. Los resultados mostraron que con la utilización de los biofertilizantes se obtuvieron plántulas más robustas, vigorosas y de mayor calidad; además la utilización conjunta de estos bioproductos permitió reducir la dosis de fertilizante mineral nitrogenado y fosfórico en 25 % y 50 % respectivamente, con el consiguiente beneficio económico y ambiental.

**Palabras Claves:** Tabaco, biofertilizante, *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megatherium*.

## INTRODUCCIÓN:

La utilización de los microorganismos del suelo constituye una de las alternativas nutricionales más aceptadas dentro del contexto agrícola mundial y desempeña un papel importante no solo en los modelos de agricultura sostenible, donde su aplicación es imprescindible, sino también, dentro de los sistemas agrícolas de alta productividad, debido a su bajo costo de producción y la posibilidad de su reproducción a partir de recursos locales renovables (Altieri, 1997).

Un aspecto muy importante que debe profundizarse en las investigaciones sobre microorganismos biofertilizantes es el que corresponde a la obtención de inoculantes mixtos, (Dibut, 2003), que contengan organismos capaces de realizar distintas funciones con alta efectividad, lo cual puede simplificar las aplicaciones y reducir el costo de los productos. Pero en el mundo se han realizado escasos estudios en relación con la inoculación simultánea de varios microorganismos, gran parte de los cuales, además, no han rebasado el nivel de los suelos esterilizados, lo que aleja a estos estudios de la práctica agrícola (Lino y col., 2004).

Abbass y Okon, (1993) estudiaron el efecto de la inoculación simultánea de *Rhizobium* y *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* sobre el rendimiento de algunos cultivos y reportaron un incremento superior a los que se lograban con la inoculación independiente.

Autores como Pacovsky (1986) y Subba Rao et al (1996) han planteado que el suplemento de fósforo aportado por los solubilizadores puede contribuir a incrementar la eficiencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Así, en inoculaciones conjuntas de *Azotobacter chroococcum*,

*B. megatherium* y *Pseudomonas fluorescens* a varias especies hortícolas se encontró un notable incremento del rendimiento (Azcón y col., 1975).

Aprovechando estos conocimientos, se realizó un experimento con el objetivo de evaluar el efecto de las aplicaciones de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* sobre las características morfofisiológicas de las plántulas de tabaco cultivadas en semilleros tecnificados.

## MATERIALES Y METODOS

El experimento se desarrolló en la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, Pinar del Río, durante las campañas tabacaleras 2008/2009 y 2009/2010. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con un modelo trifactorial, tres réplicas y 18 tratamientos resultantes de la combinación de dos niveles de fertilizante nitrogenado (el 100 % y el 75 % del fertilizante total), tres niveles de fertilizante fosfórico (el 100 %, el 75 % y el 50 % del total a aplicar), un biofertilizante simple a base de la cepa INIFAT- 12 de *Azotobacter chroococcum* con el nombre comercial de DIMARGÓN y la mezcla de este con la bacteria solubilizadora del fósforo del suelo *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*.

Los tratamientos estudiados fueron:

- 1- 100 % N+ 100 % P (variante testigo)
- 2- 100% N+ 100% P+ *Azotobacter*
- 3- 100% N+ 100% P + *Azotobacter* + *Bacillus meg.*
- 4- 100% N+ 75% P
- 5- 100% N+ 75% P + *Azotobacter*
- 6- 100% N+ 75% P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg.*
- 7- 100% N + 50% P
- 8- 100% N+ 50% P + *Azotobacter*
- 9- 100% N + 50% P + *Azotobacter*+ *Bacillus Meg*
10. 75% N+ 100% P
11. 75% N+ 100% P+ *Azotobacter*
12. 75% N+ 100% P + *Azotobacter* + *Bacillus meg.*
13. 75% N+ 75% P
14. 75% N+ 75% P + *Azotobacter*
15. 75% N+ 75% P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg.*
16. 75% N + 50% P
17. 75% N+ 50% P + *Azotobacter*
18. 75% N + 50% P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg*

Las dosis a aplicar de los biofertilizantes fue de 2 L/ha para ambos casos; estos se inocularon en el momento de la siembra y antes del riego por aspersión.

Se utilizaron como portadores para la aplicación de fertilizante mineral: Nitrato de Amonio, Super Fosfato Sencillo, Sulfato de Potasio y Sulfato de Magnesio. En todos los casos en la fertilización mineral el Potasio y el Magnesio se aplicaron según la dosis recomendada en el Manual Técnico para la producción de plántulas de Tabaco negro (MINAGRI, 2001). Se tomaron 30 plantas al azar en cada variante a los 45 días después de la germinación y a cada una de ellas se le realizaron las siguientes observaciones y mediciones según metodología descrita por Fristyk (1969).

1. Diámetro del tallo (mm), con pie de rey de precisión  $\pm 0.01$  mm.
2. Longitud del tallo (cm), con regla graduada de precisión  $\pm 0.1$  mm
3. Masa fresca y seca total (g), método gravimétrico, en balanza analítica de precisión  $\pm 0.1$  mg.
4. Población de *Azotobacter* en la zona rizosférica, mediante el conteo de viable o UFC de *Azotobacter* en placas con el medio ASBHY.
5. Área Foliar ( $\text{dm}^2$ ) método gravimétrico, en balanza analítica de precisión  $\pm 0.1$  mg.
6. Clorofila (SPAD)

Se utilizó un análisis estadístico de clasificación doble y las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan con una probabilidad del error menor e igual a 0.05 (Lerch 1977).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tabla 1. Efecto de las combinaciones de los biofertilizantes con la fertilización mineral en las características morfofisiológicas de las plántulas de tabaco.

Tratamientos.	Longitud del tallo (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Relación Masa fresca/ Masa seca (g)	Área foliar (dm <sup>2</sup> )	Población de <i>Azotobacter</i> en la rizósfera	Clorofila (SPAD)
1-100 % N+ 100 % P (Testigo)	13,43 abc	3,63 abc	14,86 ef	1,93 i	2x10 <sup>4</sup>	31,26 bc
2-100 % N+ 100 % P+ <i>Azotobacter</i>	12,93 abcd	3,60 abcd	14,45 i	2,99 de	8x10 <sup>6</sup>	30,10 de
3-100 % N+ 100 % P + <i>Azotob.</i> + <i>Bac. Meg</i>	12,22 cde	3,37 bcd	14,93 e	2,76 g	1.5x10 <sup>7</sup>	31,71 ab
4-100 % N+ 75 % P	10,99 efgh	3,37 bcd	15,37 d	2,95 ef	1x10 <sup>5</sup>	31,49 b
5-100 % N+ 75 % P + <i>Azotobacter</i>	12,40 bcd	3,31 de	16,60 a	2,54 h	4x10 <sup>6</sup>	30,56 cd
6-100 % N+ 75 % P + <i>Azotob.</i> + <i>Bac. meg.</i>	11,90 def	3,39 bcd	15,72 b	2,95 ef	2.2x10 <sup>7</sup>	29,87 de
7-100 % N + 50 % P	8,70 i	3,05 e	14,83 f	2,79 g	6x10 <sup>4</sup>	29,30 fg
8-100 % N + 50 % P + <i>Azotobacter</i>	11,71 defg	3,31 de	13,90 l	3,08 c	9x10 <sup>6</sup>	29,45 efg
9-100 % N + 50 % P + <i>Azotob.</i> + <i>Bac. Meg</i>	13,87 a	3,41 abcd	13,23 n	3,34 b	7x10 <sup>6</sup>	30,96 bc
10-75 % N+ 100 % P	10,40 h	3,32 cde	14,26 j	2,76 g	3x10 <sup>4</sup>	28,33hi
11-75 % N+ 100 % P+ <i>Azotobacter</i>	10,07 h	3,67 ab	13,73 m	1,99 i	8x10 <sup>6</sup>	32,27 a
12- 75 % N+ 100 % P + <i>Azotob</i> + <i>Bac. meg.</i>	13,67 ab	3,54 abcd	13,98 k	3,02 cd	8x10 <sup>6</sup>	28,17 i
13-75 % N+ 75 % P	11,03 efgh	3,29 de	14,71 g	2,75 g	6x10 <sup>5</sup>	28,99 gh
14-75 % N+ 75 % P + <i>Azotobacter</i>	12,47 bcd	3,40 abcd	14,28 j	2,81 g	7x10 <sup>6</sup>	29,29 fg
15-75 % N+ 75 % P + <i>Azotob.</i> + <i>Bac. Meg</i>	13,42 abc	3,41 abcd	14,53 h	2,92 f	3x10 <sup>6</sup>	32,31 a
16-75 % N + 50 % P	10,67 fgh	3,05 e	15,48 c	2,81 g	1x10 <sup>5</sup>	28,39 hi
17-75 % N+ 50 % P + <i>Azotobacter</i>	10,53 gh	3,44 abcd	12,36 ñ	3,32 b	8x10 <sup>6</sup>	29,35 efg
18-75 % N + 50 % P + <i>Azotob.</i> + <i>Bac. Meg</i>	12,73 abcd	3,70 a	15,46 c	3,55 a	9x10 <sup>6</sup>	28,83 ghi
(ESx(±))	0,408	0,092	0,026	0,212	-	0,251
CV (%)	17,47	11,42	6,60	13,78	-	4.59

Como puede apreciarse en la Tabla 1, en las características analizadas para todos los tratamientos donde no hubo diferencia con la variante testigo, estuvo presente un biofertilizante ya sea *Azotobacter* solo o mezclado con el *Bacillus*. Es de destacar que aún disminuyendo la dosis de fertilizante nitrogenado y fosfórico en un 25 % o un 50 % según sea el caso, se obtuvieron resultados satisfactorios sin diferencias estadísticas con el tratamiento testigo, lo que constituye un resultado muy importante para el cultivo del tabaco, el cual es muy exigente a la fertilización mineral y con la utilización de los biofertilizantes se puede dar pasos de avances en vías de la sustentabilidad de los sistemas agrícolas tabacaleros (Martínez Viera, 2006).

En lo que respecta a la longitud del tallo, los mejores resultados corresponden a las variantes 9, 12 y 15, las cuales contienen las dos bacterias y a las que se reduce 25 % de nitrógeno y 25 % - 50 % de fósforo. Estas variantes no difieren significativamente del tratamiento testigo ni del tratamiento 2 y 18 y si del resto de los tratamientos. En el diámetro del tallo pueden verse los mejores resultados en las variantes 11 y 18 sin diferencias estadísticas significativas con los tratamientos 1, 2, 9, 12, 14, 15 y 17 y si con el resto de los tratamientos. La relación masa fresca/ masa seca es extraordinariamente influida por las sustancias activas sintetizadas por *Azotobacter* y *Bacillus* y puede reducirse la cantidad de fósforo y nitrógeno necesaria, en este caso las mejores variantes fueron 8, 9, 11, 12 y 17 con diferencias estadísticas para el resto de los tratamientos. La mayor área foliar se obtuvo en la variante 18, con la participación conjunta de ambas bacterias y la reducción de 25 % de nitrógeno y 50% de fósforo. Esto es un indicador importante en las plántulas ya que el área foliar está relacionado directamente con la actividad fotosintética, que es la función fundamental de las hojas en las plantas. Los tratamientos con mayor contenido de clorofila fueron 3, 11 y 15 los cuales, excepto el 11, tienen a las dos bacterias y una reducción en el tratamiento 15 de 25 % de fósforo y nitrógeno, aunque en sentido general el contenido de clorofila es bajo según Izquierdo et al. (2007) y Blandon (2008) los cuales determinaron que los niveles de clorofila en el momento del trasplante deben ser de 35 a 37 SPAD.

Asimismo, estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores como Dobbelaere et al., (2003) y Martínez Viera (2007) en investigaciones que han demostrado la capacidad de los microorganismos de fijar en la rizosfera el nitrógeno atmosférico, solubilizar el fósforo fijado en el suelo, movilizar macro y micronutrientes a través de la mineralización, sintetizar sustancias con características antibióticas o de biocontrol, estimular la formación de agregados en el suelo y otras funciones fisiológico-bioquímicas que se realizan por la asociación microorganismos-raíces en las más variadas especies de plantas con una amplia diversidad genética.

En el caso del *Azotobacter*, se pone de manifiesto la reducción de la población en función del tiempo en la zona rizosférica de las plantas, lo cual está en correspondencia con lo planteado por Martínez Viera y col.(2004), quienes demostraron que en las condiciones tropicales de Cuba, y en diversos cultivos como la papa, el pepino y el tomate, las poblaciones de *Azotobacter chroococcum*, cuyos niveles después de la inoculación, equivalen aproximadamente a  $10^9$  células/g de suelo rizosférico, recuperan su nivel natural ( $10^4$ - $10^5$ ) en un período máximo de 4 meses, según el cultivo. Es decir, que no hay una contaminación a largo plazo, debido al empobrecimiento de las secreciones radiculares por el envejecimiento de las plantas y al antagonismo de otras poblaciones microbianas del suelo.

En el caso de los tratamientos donde se utilizó el inoculante mixto se corroboran los resultados obtenidos por Martínez Viera y Dibut (2006) y Dibut y col. (2009) en cuanto a la co-inoculación con las bacterias *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, los cuales lograron una estimulación entre el 9 % y el 53 % los diferentes indicadores del crecimiento y desarrollo de los cultivos de tomate, zanahoria, lechuga y remolacha.

Con este resultado se logra disminuir la fertilización mineral nitrogenada y fosfórica en un 25 % y un 50 % respectivamente, teniendo en cuenta el uso de los biofertilizantes los cuales son un componente vital de los sistemas sustentables y que con anterioridad no se utilizaban en este

cultivo. Esto conlleva a una menor agresividad al medio ambiente al reducir la contaminación del suelo y las aguas subterráneas.

## CONCLUSIONES.

- Las mejores variantes en todas las mediciones realizadas resultaron ser (9) 100 % N + 50 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg*; (11) 75 % N+ 100 % P+ *Azotobacter*; (12) 75 % N+ 100 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg*; (15) 75 % N+ 75 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg* y (18) 75 % N + 50 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg*.
- Con la inoculación del *Azotobacter chroococcum* y la co-inoculación de este con el *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* se mejoraron las características morfofisiológicas de las plántulas, tal como la longitud y el diámetro del tallo, la relación masa fresca/ masa seca, el área foliar y la clorofila.
- Con la utilización de estos biofertilizantes se puede disminuir la dosis de fertilizante mineral nitrogenado y fosfórico en un 25 % y un 50 % respectivamente.

## REFERENCIAS

1. Abbass, Z. and Y. Okon.: Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 25(8):1075-1083, 1993.
2. Altieri, M. A.: Agroecología. Bases Científicas para una agricultura sustentable. 249 pp., Ed CLADES. ACAO, La Habana, 1997.
3. Azcón, R., M. Gómez y J. M. Barea: Efectos de la aplicación conjunta de fertilizantes químicos y microbianos en cultivos enarenados. *An. De Edafología y Agrobiología*, 33 (9-10): 863- 870. 1975.
4. Chandra, K.; Karmakar, J. B; Singh, K. J.: Effect of combined used of inorganic nitrogen and *Azotobacter* cultive in rice at the agro-climatic conditions of Manipur. *ENVIRON-ECOL*. Vol 13, No. 2. pp 595-597, 1995.
5. Blandon López, Y.: Combinación de microelementos - magnesio con albúmina - sacarosa en la producción de propágulos en canteros tecnificados, con sustrato de residuos de pino. Trabajo de Diploma Facultad de Forestal y Agronomía Departamento de Producción Agropecuaria Hnos Saiz Montes de Oca. 2008.
6. Dibut Álvarez, B.: Biofertilización: biotecnología indispensable para el desarrollo de la agricultura sostenible. En: *Memorias III Congreso Internacional de Biotecnologías para la Región Latinoamericana (CINBIOS)*; Yucatán. 2003.
7. Dibut Álvarez, B.; Martínez Viera, R.; García Maricel; Ríos Yoania; García Rosa; Tejeda Grises, Plana Liuba, Rodríguez Yanet; Fey, L.; Soca, U.; Mesa, E.: Introducción en la práctica agrícola de un nuevo biopreparado mixto para el beneficio de cultivos hortícolas de importancia económica. En *Memorias de la XII Jornada Científica por el 105 Aniversario de la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas*. INIFAT, ISBN 978-959-282-086-9. del 1 al 3 de Abril. 2009.
8. Dobbelaere, S., A. Croonenborghs and A. Tiss: *Azospirillum*. *Aust. J.Plant Physiol.*, 28 :871-879. 2003.
9. Fristyk, A.: Selección y ennoblecimiento de las variedades de Tabaco. Capítulo II: Semillería en el Tabaco. Ciencia y Técnica Instituto del Libro, La Habana, 1<sup>era</sup> edición, pp., 69-94, 1969.
10. Izquierdo Medina, A., García Betty, Rodríguez N. y León Yarilis: Influencia de los portadores nitrogenados en la incidencia de las manchas del tabaco seco y en las características agroproductivas del cultivo del tabaco bajo tela. L-3-08. Instituto de Investigaciones del Tabaco. 2007.
11. Lino A., Arozarena, N.; Dibut , B.; Ríos,Y.; Fernández, J.; Ramos, H.; Creacgh.: Evaluación de la aplicación conjunta de biofertilizantes en el cultivo del tomate

(*Solanum Lycopersicum*, L.): En Congreso Científico del INCA (14: 2004, nov. 9-12; La Habana). Memorias CD-ROOM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2004. ISBN- 959-7023-27-X

12. Lerch, G. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas.- 452 pp. Ed Científico Técnica, La Habana, 1977.
13. Martínez Viera, R., B. Dibut, G. Tejeda y R. García (2004): Reducción de la fertilización nitrogenada en distintos cultivos económicos mediante la aplicación de biofertilizantes. En: Memorias del Congreso "Trópico 2004", La Habana, CD.
14. Martínez Viera R. (2007): La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en el medio tropical. Ministerio de Agricultura y Tierras, Caracas, Venezuela, 183 pp.
15. Martínez Viera, R.: Los biofertilizantes y bioestimuladores bacterianos como pilares básicos de la Agroecología. Ed. CIARA, Caracas, 35 pp. 2006.
16. Martínez Viera, R., y B. Dibut: Practical applications of Bacterial Biofertilizers and Biostimulators. En: Biological Approachs to Sustainable Soil Systems, Francis and Taylor Publ., Nueva York, pp 467-477. 2006.
17. Ministerio de la Agricultura. Cuba. Dirección Nacional de Tabaco.: *Manual Técnico para la producción de posturas de Tabaco*, Ed AGRINFOR, La Habana, 2001.
18. Subba Rao, N. S.: "Interaction of nitrogen- fixing microorganisms with other soil microorganism". En: Biological nitrogen fixation, Ed. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 37-63. 1996.