

ANALISIS DE LA MICROFLORA ASOCIADA AL MANEJO AGROECOLOGICO EN LA RECUPERACION DE TEPETATES

Analysis of Microflora Associated to Agroecological Management in the Reclamation of Tepetates

J. D. Alvarez-Solis ¹, Ronald Ferrera-Cerrato ¹ y Claude Zebrowski ²

¹ Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

² ORSTOM, México.

Palabras clave: Tepetate, Comunidad microbiana, *Rhizobium*, *Azospirillum*.

Index words: Tepetate, Microbian community, *Rhizobium*, *Azospirillum*.

RESUMEN

En un tepetate sin roturar se encontró una escasa comunidad microbiana (2.3×10^4 bacterias, 11.8×10^3 actinomicetos y 6.57×10^1 hongos), pero ésta incrementó posteriormente con la roturación (5.97×10^4 bacterias, 19.6×10^3 actinomicetos y 12.9×10^1 hongos) y a la incorporación de estiércol de bovino (2.49×10^6 bacterias, 13.5×10^4 actinomicetos y 6.5×10^2 hongos). Se observó, además, un efecto estimulador de la rizósfera de las plantas cultivadas. Las poblaciones de *Rhizobium* y de *Azospirillum* introducidas al tepetate, se establecieron en la rizósfera de sus macrosimbiontes 50 días después de la siembra (en promedio 5.13×10^4 y 2.01×10^4 , respectivamente), pero posteriormente declinaron. El porcentaje de infección con *Rhizobium* introducido fue similar en el tepetate sin y con estiércol de bovino; sin embargo, *Azospirillum* introducido infectó más al maíz en el tepetate sin incorporación de estiércol.

SUMMARY

The microbial community found in a non-tilled tepetate was scarce (2.3×10^4 bacteria, 11.8×10^3 actinomycetes, and 6.57×10^1 fungi), however, the number of microorganism increased when the tepetate was ripped off by tillage (5.97×10^4 bacteria, 19.6×10^3 actinomycetes and 12.9×10^1 fungi) and after farm manure addition (2.49×10^6 bacteria, 13.5×10^4 actinomycetes and 6.5×10^2 fungi). A stimulant effect was observed on the rhizosphere of cultivated plants. *Rhizobium* and *Azospirillum* populations incorporated to tepetate soil established in the rhizosphere of their macrosymbionts 50 days after sowing (in the average, 5.13×10^4 and 2.01×10^4 , respectively) but declined later. *Rhizobium* infection percentage was similar in tepetate with and without cow manure, although corn without manure was more infected with introduced *Azospirillum*.

INTRODUCCION

La incorporación a la producción agrícola, pecuaria y forestal de las áreas tepetatosas

erosionadas requiere de un elevado ingreso de energía externa, mecánica o manual para su roturación y química para mejorar el bajo nivel nutrimental, especialmente de nitrógeno y de fósforo (García, 1961; Zebrowski *et al.*, 1989).

Varios estudios han señalado la importancia del bajo nivel de materia orgánica como un factor limitante en la capacidad productiva del tepetate (García, 1961; Valdez, 1970; Rey, 1979; Cajuste y Cruz, 1987) y de los beneficios de la incorporación de materiales orgánicos en la estructura y en la actividad biológica del tepetate (Tovar, 1987; Sánchez *et al.*, 1987).

El costo económico y eventualmente ambiental que implica el elevar los niveles nutrimentales con base en la aplicación de fertilizantes sintéticos hace necesaria la búsqueda de alternativas que permitan disminuir la dependencia de insumos sintéticos y mejoren el contenido de materia orgánica, la estructura y la actividad biológica del tepetate.

Existen prácticas ancestrales de manejo agroecológico, tales como el uso de policultivos, rotación de cultivos y la incorporación de materiales orgánicos que han mostrado su viabilidad durante cientos de años por su efecto en la conservación y en el mejoramiento de la fertilidad del suelo (Mountjoy y Gliessman, 1988; Altieri, 1987; Gliessman, 1990).

En el agroecosistema, las raíces de las plantas se encuentran asociadas además del ambiente inanimado, compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas, a una vasta comunidad de microorganismos metabólicamente activos, los cuales afectan la nutrición de las plantas en forma favorable o perjudicial, dependiendo de los microorganismos involucrados y de las condiciones ambientales (Schippers *et al.*, 1987).

El presente trabajo tiene como objetivo conocer el efecto del uso de cultivos asociados (maíz-frijol-haba), un cultivo de rotación (veza) e incorporación de materia orgánica (estiércol de bovino), sobre la comunidad microbiana nativa (bacteria, actinomicetos y hongos) y en poblaciones de microorganismos introducidos (*Rhizobium*

y *Azospirillum*) en el proceso de recuperación de la capacidad productiva del tepetate.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación y Diseño Experimental

El trabajo de campo se realizó en Tlalpan, municipio de Hueyotlipan en el Estado de Tlaxcala, México. El experimento se estableció después de una roturación y construcción de terrazas; bajo un diseño de parcelas divididas, ordenadas en bloques al azar con cuatro repeticiones. Se utilizó la asociación maíz-frijol-haba y la veza como cultivo de rotación con o sin inóculo de bacterias simbióticas fijadoras del nitrógeno atmosférico (*Rhizobium* y *Azospirillum*) y la endomicorriza V-A (*Glomus sp.*), con o sin incorporación de materia orgánica (estiércol de bovino, 0 y 40 ton/ha). En todos los casos se aplicó superfosfato simple (60 kg de P /ha). La unidad experimental estuvo integrada por cinco surcos de 4 m de longitud, con una distancia entre surcos de 0.8 m.

Los tratamientos establecidos fueron:

1. Maíz/frijol asociados y haba intercalada, con materia orgánica (MO).
2. Maíz/frijol asociados y haba intercalada sin MO.
3. Veza inoculada y con MO (para rotación).
4. Veza inoculada sin MO (para rotación).
5. Maíz/frijol asociados y haba intercalada inoculados + micorriza vesículo-arbuscular (MVA) con MO.
6. Maíz/frijol asociados y haba intercalada inoculados + MVA sin MO.
7. Manejo del agricultor (maíz/frijol y haba sin MO, sin inoculación, sin MVA), con fertilizante en 120-60-00 (N-P-K)

Obtención de Inóculos e Inoculación

Las cepas de *Rhizobium* y de *Azospirillum* introducidas corresponden a la colección del

Laboratorio de Microbiología del Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. Se utilizó para maíz la cepa CPMEX-167 de *Azospirillum* sp. marcada por resistencia a estreptomycin (500 µg/ml) y a espectinomycin (500 µg/ml); para frijol la cepa CPMEX-111 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* marcada por resistencia a kanamicina (1,000 µg/ml); las cepas de *R. leguminosarum* bv. *viceae* CPMEX-107 y CPMEX-108 para el haba y las cepas CPMEX-169 y CPMEX-170 para la veza.

La preparación de los inoculantes y su aplicación a la semilla en el campo se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Vincent (1970), utilizando turba molida, neutralizada y estéril como soporte.

Muestreos y Análisis Microbiológicos

Antes y después de la roturación e incorporación de la materia orgánica, así como a los 50 días después de la siembra se colectaron muestras de tepetate y tepetate rizosférico, el cual se obtuvo a partir de la colecta de dos plantas de cada especie en cada una de las unidades experimentales. El tepetate no rizosférico se colectó a 25 cm de la planta más cercana y se tomaron muestras de tepetate sin cultivo y sin materia orgánica. Se elaboraron dos muestras compuestas para cada tratamiento y se procesaron siguiendo la técnica de dilución seriada y vaciado en placa con medio selectivo.

El número de unidades formadoras de colonias se obtuvo utilizando los siguientes medios nutritivos: para bacterias, extracto de suelo-glucosa-agar modificado para estudios de rizósfera (Echegaray, 1991); para actinomicetos agar Czapeck-Dox (Merck); para *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, el extracto de levadura-manitol-agar con rojo congo (Vincent, 1970) con 1000 µg/ml de kanamicina; para *Azospirillum* sp., el DNFB (Dobereiner y Day, 1974) con 500 µg/ml de estreptomycin y espectinomycin. A todos los medios nutritivos anteriores se les adicionó 40 µg/ml de actidiona

(ciclohexamide, Sigma Co.). Para cuantificar a los hongos se empleó el medio papa-dextrosa-agar (Difco) con 50 µg/ml de estreptomycin.

RESULTADOS Y DISCUSION

Poblaciones de Bacterias, Actinomicetos y Hongos

En el Cuadro 1 se observa que en el tepetate sin roturar se encontró una escasa comunidad microbiana, la cual se incrementó posterior a la roturación y a la incorporación de la materia orgánica, aun cuando ésta fue menor a la observada en un suelo de cultivo adyacente utilizado como testigo.

La escasa comunidad microbiana encontrada en el tepetate sin roturar puede estar relacionada con el bajo intercambio gaseoso que ocurre en el tepetate debido a la cementación de estos horizontes con la sílice soluble y/o el carbonato de calcio (Valdez, 1970); de tal forma que con la roturación se mejora el intercambio gaseoso y la actividad fisiológica de los microorganismos, aun cuando ésta queda limitada por la baja disponibilidad de compuestos orgánicos para el metabolismo microbiano. Sánchez et al. (1987) observaron en condiciones de invernadero una escasa comunidad microbiana en el tepetate, la cual se incrementó con la adición de estiércoles de bovino y gallinaza.

Cuadro 1. Efecto de la roturación y de la incorporación de materia orgánica en las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos.

Tepetate	Unidades formadoras de colonias		
	Bacterias	Actino- micetos	Hongos
Sin roturación	2.23 x 10 ⁴	11.8 x 10 ³	6.57 x 10 ¹
Con roturación	5.97 x 10 ⁴	19.6 x 10 ³	12.90 x 10 ¹
Sin materia orgánica	9.89 x 10 ⁴	34.9 x 10 ³	17.30 x 10 ¹
Con materia orgánica	2.49 x 10 ⁶	13.5 x 10 ⁴	6.50 x 10 ²
Testigo: Suelo agrícola adyacente	4.59 x 10 ⁷	2.11 x 10 ⁵	39.6 x 10 ²

En el muestreo del tepetate realizado a los 50 días después de la siembra, se observó un efecto estimulante de la rizósfera sobre las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos; el cual aumentó cuando se incorporó materia orgánica (Cuadro 2). La comunidad microbiana en la rizósfera del maíz, frijol, haba y veza fue mayor a la del tepetate a distancia (25 cm de la raíz) y a la del tepetate sin cultivo y sin materia orgánica.

Cuadro 2. Efecto rizosférico del maíz, frijol, haba y veza en las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos a los 50 días después de la siembra en tepetate.

Tepetate	Rizósfera	Unidades formadoras de colonias		
		Bacterias	Actino- micetos	Hongos
Sin materia orgánica	Maíz	31×10^6	7.0×10^4	1.9×10^4
	Frijol	98×10^6	30.0×10^4	1.5×10^3
	Haba	16×10^7	1.4×10^5	2.5×10^3
	Veza	54×10^6	8.2×10^4	1.9×10^3
	A distancia	32×10^5	9.3×10^4	8.8×10^2
Con materia orgánica	Maíz	16×10^7	8.0×10^5	5.8×10^3
	Frijol	16×10^7	11.0×10^5	1.9×10^3
	Haba	38×10^7	1.3×10^6	6.3×10^3
	Veza	20×10^7	1.8×10^6	4.7×10^3
	A distancia	63×10^6	8.6×10^5	4.7×10^3
Sin materia orgánica y sin cultivo		49×10^5	12.5×10^4	4.4×10^2

Un índice utilizado en microbiología para conocer el efecto rizosférico lo constituye la relación suelo-rizósfera. En el presente trabajo se observó que fueron las bacterias las que presentaron mayor estimulación rizosférica y en menor grado los hongos y los actinomicetos, lo cual está de acuerdo con lo reportado por Alexander (1981). Para las bacterias, la relación en el tepetate sin cultivo, y en la rizósfera del tepetate sin incorporación de materia orgánica, fue de 1:6 en el maíz, 1:20 en el frijol, 1:33 en el haba y 1:11 en la veza; mientras que cuando se incorporó la materia orgánica, la relación fue de 1:33, 1:34, 1:78 y 1:42 en maíz, frijol, haba y veza, respectivamente.

La estimulación del crecimiento microbiano en la rizósfera es debido principalmente a la disponibilidad de compuestos orgánicos secretados por las raíces de las plantas cultivadas (Keith *et al.*, 1986; Martín y Kemp, 1986 y Jansen y Bruinsma, 1989).

Sobrevivencia de *Rhizobium* y de *Azospirillum*

La sobrevivencia de las bacterias simbióticas fijadoras del nitrógeno atmosférico introducidas al tepetate al momento de la siembra, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (CPMEX-111) y *Azospirillum* sp. (CPMEX-167), cambió ligeramente en función de la incorporación de la materia orgánica. *Rhizobium* presentó valores más altos en la rizósfera del frijol en el tepetate sin incorporación de materia orgánica; mientras que en la rizósfera del maíz, *Azospirillum* presentó mayor número en el tepetate con materia orgánica (Cuadro 3). Estos resultados evidencian que a los 50 días después de la siembra, *Rhizobium* y *Azospirillum* se encuentran establecidos en la rizósfera de sus respectivos macrosimbiontes. Sin embargo, en los muestreos posteriores (100 y 168 días después de la siembra) las poblaciones de ambos microorganismos disminuyeron progresivamente.

Cuadro 3. Sobrevivencia de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (CPMEX-111) y de *Azospirillum* sp. (CPMEX-167) en tepetate rizosférico de frijol y maíz, respectivamente, a los 50 días después de la siembra.

	<i>Rhizobium</i>	<i>Azospirillum</i>
Sin materia orgánica	8.94×10^4	1.18×10^4
Con materia orgánica	1.33×10^4	2.84×10^4

No obstante el alto número de *Rhizobium* y de *Azospirillum* observado en la rizósfera a los 50 días después de la siembra, los porcentajes de infección de ambos microsimbiontes fue notoriamente bajo. De los nódulos formados en la raíz del frijol, la cepa de *Rhizobium* introducida indujo el 7.3% y el 8.9%, respectivamente, en el tepetate sin y con incorporación de materia orgánica. Las plantas de maíz presentaron un porcentaje de infección por *Azospirillum* de 34.5 y 39.8, respectivamente, en el tepetate sin y con incorporación de materia orgánica, del cual el 20.3 y el 7.5%, respectivamente, correspondió a la cepa de *Azospirillum* introducida.

El bajo porcentaje de infección que presentó la cepa de *Rhizobium* introducida puede estar relacionado con la presencia de cepas nativas en

el tepetate que compitieron por los sitios de infección en la raíz del frijol, ya que aunque no se determinó el NMP de rizobia nativa, los controles sin inocular presentaron un número de nódulos similar al de las plantas inoculadas (datos no presentados). Dowling y Broughton (1986) señalan que uno de los factores que más afecta el éxito de la inoculación en el campo lo constituye la presencia de cepas nativas.

CONCLUSIONES

Las prácticas de manejo, tales como la rotación y la incorporación de estiércol de bovino,

estimulan la actividad de la comunidad microbiana del tepetate, lo que aunado a la estimulación rizosférica de las plantas cultivadas resulta en un incremento en las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos.

Las poblaciones de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* y de *Azospirillum* sp. se establecen en el tepetate sin y con incorporación de estiércol de bovino y alcanzan valores altos en la rizósfera de sus respectivos macrosimbiontes a los 50 días después de la siembra, para posteriormente declinar.

LITERATURA CITADA

- ALTIERI, M. A. 1987. Agroecology: The scientific basis of alternative agriculture. Westview Press, Boulder, Colorado, USA.
- ALEXANDER, M. 1981. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Ed., D.F., México.
- CAJUSTE, L. J. y D. J. CRUZ. 1987. Presencia de materiales amorfos en algunos tepetates de la zona de influencia de Chapingo, pp. 69-77. In: J. F. Ruiz F. (ed). Uso y manejo de los tepetates para el desarrollo rural. UACH, Chapingo, México.
- DOBEREINER, J. y D. J. DAY. 1974. Associative symbiosis in tropical grasses of microorganisms and dinitrogen fixing species, 2: 518-539. In: W Newton and C. J. Nyman. (eds.) Proceedings of the first International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State, University Press Pullman, U.S.A.
- DOWLING, D. N. y W. J. BROUGHTON. 1986. Competition for nodulation of legumes. Ann. Rev. Microbiol. 40: 131-157.
- ECHEGARAY, A. 1991. Manual de prácticas de microbiología. CEDAF, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- GARCIA E., A. 1961. Estudio de los suelos tepetatosos y de las posibilidades de recuperación agrícola. Tesis de Ing. Agrónomo Especialista en Suelos. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.
- GLIESSMAN, S. R. 1990. Agroecology: Researching the ecological basis for sustainable agriculture. Springer-Verlag, New-York, N.Y., USA.
- JANSEN, H. H. y BRUINSMAN. 1989. Methodology for the quantification of root and rhizosphere nitrogen dynamics by exposure of shoots to ¹⁵N-labeled ammonia. Soil Biol. Biochem. 21: 189-196.
- KEITH, H., J. M. OADES y J. K. MARTIN. 1986. Input of carbon to soil from wheat plants. Soil Biol. Biochem. 18: 445-449.
- MARTIN, J. M. y J. R. KEMP. 1986. The measurement of C transfers within the rhizosphere of wheat grown in field plots. Soil Biol. Biochem. 18: 103-108.
- MOUNTJOY, D. C. y S. R. GLIESSMAN. 1988. Traditional management of a hillside agroecosystem in Tlaxcala, Mexico: an ecologically based maintenance system. Am. J. of Alternative Agriculture 3: 3-10.
- REY C., J. A. 1979. Estimación de la erodabilidad de los tepetates en la cuenca del río Texcoco en base al factor K. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- SANCHEZ J., M., F. J. RUIZ F. y E. CUAUTLE F. 1987. Comportamiento de dos tipos de tepetates bajo la adición de abonos orgánicos y abonos verdes en condiciones de invernadero, pp. 50-68. In: J. F. Ruiz F. (ed.) Uso y manejo de los tepetates para el desarrollo rural. UACH, Chapingo, México.
- SCHIPPERS, B., A.W. BAKKER y A.H.M. BAKKER. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and their effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytopathology 25: 339-358.

TOVAR T., A. 1987. Determinación del efecto de aplicación de estiércol de bovino semiseco y fresco sobre el rendimiento de cebada en suelos erosionados, pp. 156-171. In: J. F. Ruíz F. (ed.) *Uso y manejo de los tepetates para el desarrollo rural*. UACH, Chapingo, México.

VALDEZ M., L. A. 1970. Características morfológicas y mineralógicas de los suelos de tepetate en la Cuenca de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

VINCENT J., M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Int. Biol. Programme. Blackwell Scientific Pub. Oxford, GB. 164 p.

ZEBROWSKI, C., D. PEÑA H., M.L.M. ORTIZ S. y D. J. ETCHEVERS B. 1989. Incorporación de los tepetates a la producción agrícola: rendimiento y efectos de roturación sobre características físico-químicas de tepetates. XXIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Montecillo, México.