

Uso de *Azospirillum* spp. como biofertilizante en la producción de estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*)

Rodolfo WingChing-Jones¹, Lidieth Uribe Lorío² y Leida Castro Barquero²

1. Escuela de Zootecnia. Centro de Investigación en Nutrición Animal, Módulo Lechero-SDA, Universidad de Costa Rica, rodolfo.wingching@ucr.ac.cr
2. Escuela de Agronomía. Laboratorio de Bioprocesos. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, lidieth.uribe@ucr.ac.cr; leida.castro@ucr.ac.cr

Recibido 05-IV-2016 • Corregido 05-V-2016 • Aceptado 10-V-2016

ABSTRACT: Use of bacteria (*Azospirillum* spp.) as biofertilizer for African star grass (*Cynodon nlemfuensis*). African star grass is important in some tropical regions and can benefit from the use of biofertilizers like *Azospirillum*. We tested three strains of *Azospirillum* as biofertilizer in Turrialba, Costa Rica, from 2011 through 2013. A single dose of 5 liters per hectare was used for the three strains (10^8 UFC.ml⁻¹) and a three-way mixture of the strains; and compared with a dose of 10 tons of vermicompost and chemical fertilization (78 kg N per hectare). A second experiment evaluated *Azospirillum* for its potential to substitute chemical fertilizer in proportions of 0, 25, 50 and 75%. A dose of 5 L/ha (10^8 CFU.ml⁻¹) was used for all treatments and compared to the dose of 100% of chemical fertilizer. Two of the strains and the three-way yielded similar forage biomass (3.65 to 3.93 t/ha) as the chemical fertilizer (4.12 t/ha). Fertilization with vermicompost was lower (3.56 t/ha). A decline in rainfall from 2012 to 2013 reduced the grass biomass 25% when chemical fertilization was applied (4.07 vs 3.08 t/ha). In the second experiment, no significant differences were found in biomass yields for all treatments with *Azospirillum* or chemical fertilizer (2.97 vs 3.08 t/ha). *Azospirillum* has potential to maintain the productivity of African star grass under a grazing system, but further research is required to define the number of applications per year to maintain a constant effect.

Key words: Fertilization, biofertilizer, dry matter, yield, dairy cattle, tropical grassland.

RESUMEN: El pasto estrella africana es importante en algunas regiones tropicales y puede ser beneficioso el uso de *Azospirillum* como biofertilizante. Probamos tres cepas de *Azospirillum* en Turrialba, Costa Rica, entre el 2011 y 2013. Utilizamos una dosis única de 5 litros por hectárea para las tres cepas (10^8 UFC.ml⁻¹) y la mezcla de las tres cepas en partes iguales y las comparamos con una dosis de 10 t/ha de vermicompost y la fertilización química (78 kg N/ha). En la segunda prueba evaluamos *Azospirillum* por su potencial para sustituir el fertilizante químico en proporciones de 0, 25, 50 y 75% una dosis de 5 L / ha (10^8 UFC.ml⁻¹) utilizamos para todos los tratamientos y en comparación con la dosis de 100% de los fertilizantes químicos. Dos de las cepas y tres de las mezclas produjo biomasa forrajera similar (3,65 a 3,93 t / ha) como el fertilizante químico (4,12 t / ha). La fertilización con humus de lombriz fue menor (3,56 t / ha). Una disminución de las lluvias 2012-2013 redujo la biomasa del forraje 25% cuando se aplicó fertilización química (4,07 vs 3,08 t / ha). En el segundo experimento, no se encontraron diferencias significativas en los rendimientos de biomasa para todos los tratamientos con *Azospirillum* o fertilizantes químicos (2,97 vs 3,08 t / ha). *Azospirillum* tiene potencial para mantener la productividad del pasto estrella africana bajo un sistema de pastoreo, pero se requiere más investigación para definir el número de aplicaciones por año para mantener un efecto constante.

Palabras clave: Fertilización, biofertilizante, materia seca, rendimiento, ganado de leche, pasto tropical.

Un grupo de rizobacterias promotoras de crecimiento (RPC) que tiene gran potencial de uso como biofertilizantes, son las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum*. Estas bacterias son de vida libre y promueven el crecimiento vegetal (Giller & Wilson 1991; Baldani, Krieg, Baldani, Hartman & Dobereiner, 2005; Xie & Yokota 2005; Bashan & de Baschan, 2010; Bhattacharya & Jha, 2012).

Azospirillum puede establecer asociaciones con las raíces de gramíneas, sin embargo estas asociaciones carecen de estructuras visibles que indiquen que la planta se encuentra colonizada. Esta relación se considera una "simbiosis asociativa", ya que induce cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces de las plantas debido a la producción de hormonas de crecimiento, que favorecen la absorción de agua y minerales, lo cual sumado a la

fijación biológica de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfato, incremento en la germinación (rebrotos y semillas) y acumulación de nutrimentos en los tejidos de la planta, pueden promover el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Umali, Hubbell, Gaskins, & Dazzo, 1981; Kennedy, Choudhury & Kecskes, 2004; Podile & Kishore, 2006; Tsavkelova, Klimova, Cherdyntseva & Netrusov, 2006; Barassi et al., 2007; Bashan & de Bashan, 2010; Kaymak, 2011, Bhattacharya & Jha, 2012).

Una amplia revisión sobre los resultados de los experimentos desarrollados entre los años 1974-1994 fue realizada por Okon y Labandera-González (1994). Esta evaluación reveló que el éxito de la inoculación con cepas de *Azospirillum* fue en el rango del 60 al 70% de los experimentos realizados en suelos y regiones climáticas diferentes, con incrementos significativos entre el 5 al 30%, en el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de la inoculación en conjunto con la aplicación de niveles intermedios de fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, el éxito de los experimentos se incrementó hasta 90%. Lo que permite reducir en 40-50% el nivel de los fertilizantes sin que exista disminución en el rendimiento de la cosecha, lo cual concuerda con los hallazgos de Martínez-Morales et al. (2003) y Vivienne et al. (2004) quienes indican que la inoculación con *A. brasilense* en gramíneas como el maíz, la caña de azúcar, pastos y sorgo, aporta entre el 30 y el 50% de los requerimientos de nitrógeno a dichos cultivos. Por su parte, Hungria et al. (2010) evaluó en Brasil nueve cepas de *Azospirillum*, y encontraron que algunas de las cepas de *A. brasilense* aumentaron la producción de maíz en 24-30%, con respecto al control sin inocular, y de trigo en 13-18%, en un segundo ensayo observaron que la combinación de *A. brasilense* Ab-V5 y Ab-V6 aumentó la producción de maíz y el trigo en 27% y 31%, respectivamente. Los efectos de la inoculación se atribuyeron al aumento general en la absorción de micro y macronutrientes y no específicamente a la fijación de nitrógeno. Todos los experimentos recibieron 24 kg y 20 kg de N.ha⁻¹ para el maíz y el trigo respectivamente.

Veresoglou y Menexes (2010) evaluaron mediante una meta análisis de 59 artículos la extensión a la cuál *Azospirillum* podía contribuir a las propiedades de crecimiento del trigo y encontraron un aumento promedio de 8,9% en producción de semilla y 17,8% en peso seco aéreo. Los autores indican que los factores determinantes para el efecto promotor fueron la cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado (observándose el máximo efecto promotor en ausencia de fertilización nitrogenada) y el cultivar de trigo y especie de *Azospirillum* utilizados.

En relación con la producción de forraje se observaron incrementos en la biomasa de pastizales naturales inoculados con *A. brasilense* aún bajo condiciones de crecimiento subóptimas (Itzigsohn et al., 2000). Además en forrajes del género *Setaria*, se describe el efecto de la inoculación cuantificada como incremento en el macollamiento y la producción de raíces, así como en la reducción de la utilización del fertilizante nitrogenado aplicado (Kapulnik et al., 1981). En el caso de *Digitaria* sp., Barassi et al. (2007) observó una mayor producción de forraje debido a un incremento en la disponibilidad de N. En el caso del cultivo de sorgo, García-Olivares et al. (2006), indica un aumento en la producción de forraje por efecto de la inoculación. Con respecto al pasto Estrella africana, se indican dosis entre 0 a 300 Kg de N por hectárea al año para mantener una producción constante de forraje a través del año (Salazar, 2007). Según el análisis de los trabajos realizados en forrajes, con el uso de esta biotecnología se podría reducir hasta en 50% las aplicaciones de N al cultivo. Esta mejora en el uso eficiente del fertilizante permitiría en los sistemas de producción de leche y carne, reducir las cantidades de fertilizantes químicos para mantener la disponibilidad de forraje y disminuir el efecto residual indirecto de las aplicaciones del fertilizante.

Por tal motivo, al tener Costa Rica un porcentaje de cobertura cercano al 20,49% dedicada a la producción de forrajes (Instituto Nacional de Estadística y Censo [INEC], 2015), el empleo de tecnologías limpias para la producción de forrajes se torna de gran importancia en aspectos tanto económicos como ambientales, para los sistemas de producción de semovientes. El objetivo de este trabajo, fue definir y evaluar la cepa de *Azospirillum* más promisoría para producir pasto Estrella africana y la reducción del fertilizante nitrogenado en cada ciclo de producción.

MÉTODOS

1. Ubicación: La investigación la realizamos en un área de 5,5 ha, cubiertas con pasto Estrella Africana (*Cynodon nlemfuensis*) el cual es cosechado cada 25 días, con una permanencia promedio por los semovientes de un día en apartos de 900 metros cuadrados en promedio. Posterior a la salida de los animales, se aplica a cada apto 7 kg de nitrógeno o el equivalente a 78 kg N por hectárea. El lugar se encuentra en Turrialba, provincia de Cartago (9°54'10.18"N - 83°40'9.76"O; 610 msnm), la toma de datos la realizamos en el periodo de los años 2011 al 2013 en los meses de junio a diciembre en cada año.

2. Variables ambientales: Durante la ejecución de esta investigación recopilamos información de precipitación (mm), temperatura (°C), humedad relativa (%) y radiación solar (MJ/m²), variables que influyen en el desarrollo del forraje. Esta información la obtuvimos de las estaciones meteorológicas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), institución que se encuentra a 1 000 m de distancia del sistema de producción donde se realizó esta investigación.

3. Tratamientos evaluados y dosis aplicadas: Evaluamos tres cepas *Azospirillum oryzae* PCJ1, *A. lipoferum* PCJ2 (Ramírez et al., 2015), *A. oryzae* PCJ3 y la combinación de las tres cepas. Estas bacterias forman parte de la colección de cepas de Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA-UCR) y se encuentran congeladas en glicerol a -70°C. Además, valoramos la aplicación de vermicompost, el cual se produce a partir del crecimiento de la lombriz californiana (*Eisenia foetida*) sobre un sustrato, en este caso la boñiga de los semovientes que se encuentran en el ML-SDA. Estos cinco tratamientos no sintéticos, se compararon con el manejo propio del sistema para el cultivo del forraje (7 kg N por aparc). En el caso de las cepas de *Azospirillum* spp., estas las aplicamos con una regadera, en una dosis de 16 L por parcela, para una concentración mínima de 10⁸ UFC.ml⁻¹ de *Azospirillum* spp. Este volumen de inoculante garantizó una distribución apropiada del biofertilizante. Las cepas de *Azospirillum* spp. fueron aplicadas tres veces con un intervalo de 60 días entre aplicaciones (Julio, Agosto y Noviembre), durante los años 2011 y el 2012. Para la aplicación del vermicompost, se tomó en consideración una sola dosis, equivalente a 10 t.ha⁻¹ al año. Durante los 24 meses de evaluación, las parcelas experimentales se mantuvieron bajo un sistema de pastoreo rotacional (24 días de descanso y uno de ocupación). En el caso de las alternativas biológicas (*Azospirillum* spp. y vermicompost) no sufrieron aplicaciones de fertilizante, mientras que a las cuatro parcelas con fertilización nitrogenada, se les aplicó la dosis equivalente a los 7 kg de nitrógeno por hectárea, posterior al pastoreo durante todo el periodo experimental.

Para llevar a cabo la segunda prueba, se escogió la cepa de *Azospirillum oryzae* que lograra una producción de forraje similar o mayor a la obtenida en el tratamiento con fertilizante nitrogenado. En este caso, se establecieron cuatro tratamientos donde se aplicó la bacteria a una dosis constante de 5 L/ha (10⁸ UFC.ml⁻¹) en combinación con el fertilizante sintético a razón de 25, 50, 75 y 100%. Estos cuatro tratamientos se compararon con el programa de fertilización usado en el sistema de producción,

para el crecimiento del forraje. La bacteria se aplicó de la forma previamente descrita.

4. Diseño experimental y tamaño de la parcela: Para elegir la cepa de *Azospirillum* spp., que presentara rendimientos similares al tratamiento con fertilización nitrogenada sintética, se utilizó un diseño de bloques completos al azar, donde los tratamientos fueron distribuidos de forma aleatoria dentro del bloque. Cada bloque estaba compuesto de 6 parcelas con un tamaño promedio de 15 m² (3 m largo x 5 m ancho), separadas entre sí por sus cuatro lados por una franja de un metro de distancia entre parcelas y con el borde del aparc. Los tratamientos se repitieron cuatro veces, para un total de 24 parcelas y cuatro bloques.

En el ensayo para definir el porcentaje de sustitución del fertilizante nitrogenado que aporta la cepa de *Azospirillum* spp., se trabajó, en otra área del ML-SDA, dedicada al pastoreo de animales en producción de leche, con un diseño de bloques completos al azar, el cual contempló la división para cuatro bloques y cinco parcelas por bloque. De igual manera, se mantuvieron los cuidados para separar y aislar cada parcela de las áreas que la rodeaban, según descripción de la primera prueba.

5. Toma de la muestra y variables evaluadas: Para la determinación de la producción de biomasa fresca (t.ha⁻¹), biomasa seca (t.ha⁻¹) y el porcentaje de materia seca del pasto Estrella africana, en ambas pruebas se empleó un marco de un metro cuadrado, y se cosecho el material con machete a nivel del suelo. Para cada momento de muestreo, se escogió la esquina superior izquierda de la parcela como área del primer muestreo, y se avanzó según las manecillas del reloj para los siguientes muestreos, dando así, cinco puntos de muestreo en forma de "x", donde el segundo punto, es el centro de la parcela. Cada muestra cosechada se colocó en una bolsa plástica transparente, se pesó en una balanza con capacidad de 6 kilogramos. Posterior al pesaje, las muestras se trasladaron al Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica, para ser secadas a estufa a 60 °C, según la metodología de la AOAC (1998) para determinar el porcentaje de materia seca, y así determinar la producción de forraje en base seca por hectárea.

6. Análisis de la información: La información recolectada en ambas pruebas se organizó en una base de datos según el tratamiento aplicado, el bloque, la producción de biomasa fresca, seca y el porcentaje de materia seca. Por medio del programa PROC GLM de SAS (2003) se

realizó el análisis de regresión para definir el efecto de la aplicación del *Azospirillum* spp. sobre la producción de biomasa y el porcentaje de materia seca. Cuando se determinaron efectos significativos del modelo, la comparación de medias se realizó con ayuda de la prueba de Duncan (SAS 2003), con una probabilidad $p < 0,05$.

RESULTADOS

Producción de biomasa. Se determinaron diferencias significativas en la producción de biomasa fresca y seca por hectárea para el pasto Estrella africana, por la aplicación de los diferentes tratamientos (Cuadro 1) en cada año de evaluación. Con respecto a la biomasa fresca, todos los tratamientos con excepción de la aplicación de la cepa PCJ3 fueron similares al tratamiento nitrogenado en el año 2011, la cepa PCJ3 presentó una biomasa fresca significativamente menor que la cepa PCJ1. Dicho comportamiento se repitió en el año 2012, sin embargo, en este año, también la cepa PCJ2 fue significativamente menor que el tratamiento fertilizado. Cuando se

analiza el promedio de los dos años de estudio, se observa que el tratamiento PCJ1 es estadísticamente similar al tratamiento fertilizado.

En relación a la producción de biomasa seca, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento fertilizado con nitrógeno y los tratamientos biológicos en los años 2011 y 2012, sin embargo, cuando se promedian los dos años se observa una biomasa significativamente mayor en el tratamiento con fertilización nitrogenada que en los tratamientos PCJ3 y vermicompost. Las cepas PCJ1, PCJ2 y mezcla de cepas, no se diferenciaron del tratamiento fertilizado que presentó una producción de $4,12 \text{ t.ha}^{-1}$ (Cuadro 1).

Al comparar la producción de biomasa del pasto Estrella en los años 2011 y 2012, se observa que hubo una reducción en la productividad del sistema de un año a otro. En el Cuadro 2, se describen las variables climáticas registradas y evaluadas, donde se determinó una reducción en la precipitación aproximada del 2% al comparar los años 2011 y 2012. Lo anterior es una tendencia que se mantuvo en el año 2013 donde la precipitación fue aún menor (46%) que en el año 2012.

CUADRO 1
Respuesta en producción de biomasa y materia seca del pasto Estrella Africana

Variable evaluada	Producción de forraje (t.ha^{-1})	Tratamientos					
		<i>Azospirillum</i> spp.			Vermicompost	Fertilizante nitrogenado	
		<i>A. oryzae</i> PCJ1	<i>A. lipoferum</i> PC J2	<i>A. oryzae</i> PCJ3	Cepa (PCJ1, PCJ2, PCJ3)		
Base fresca*	2011	20,30 ^a	18,81 ^{ab}	16,94 ^b	18,06 ^{ab}	17,87 ^{ab}	20,87 ^a
	$p^{**} =$	0,0332					
	2012	16,00 ^{ab}	14,20 ^{bc}	12,40 ^c	14,80 ^{abc}	14,60 ^{abc}	17,60 ^a
	$p =$	0,0196					
	μ^{***}	18,34 ^{ab}	16,72 ^{bc}	14,87 ^c	16,58 ^{bc}	16,58 ^{bc}	19,38 ^a
	$p =$	0,0064					
Base seca	2011	4,12	3,97	3,71	3,74	3,66	4,16
	$p =$	0,3268					
	2012	3,70	3,44	2,98	3,53	3,35	4,07
	$p =$	0,0528					
	μ	3,93 ^{ab}	3,73 ^{abc}	3,38 ^c	3,65 ^{abc}	3,56 ^{bc}	4,12 ^a
	$p =$	0,0233					
Materia seca (%)	2011	20,73	21,46	22,72	21,30	21,27	20,54
	$p =$	0,0945					
	2012	23,25	24,40	24,10	24,10	23,10	23,28
	$p =$	0,3473					
	μ	21,88	22,80	23,35	22,57	22,10	21,79
	$p =$	0,2253					

* Letras diferentes en una misma fila difieren significativamente según la prueba de Duncan $p < 0,05$. **Probabilidad del modelo estadístico de regresión utilizado. *** Promedio de los años 2011 y 2012.

CUADRO 2
Descripción de las condiciones climáticas prevalecientes durante la ejecución del experimento

Mes	Precipitación total mensual			Temperatura (°C) promedio mensual			Humedad relativa (%) promedio mensual			Radiación promedio mensual (MJ/m ²)		
	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013
Enero	491,1	120,8	28,4	20,6	20,3	21,2	93,5	92,6	92,4	15,3	16,0	16,3
Febrero	124,4	111,7	20,5	21,1	20,8	21,0	92,1	91,6	91,4	17,9	18,1	17,4
Marzo	104,9	225,1	196,0	21,2	20,8	21,4	90,4	93,3	94,2	20,4	16,1	15,9
Abril	49,1	91,6	87,6	22,3	22,1	22,7	89,2	92,8	92,7	20,5	18,6	19,0
Mayo	301,9	196,5	214,0	23,0	23,1	22,6	92,4	93,4	92,7	17,8	19,8	17,3
Junio	200,1	163,9	256,6	23,2	23,1	22,7	93,1	93,8	94,8	18,0	17,9	16,5
Julio	333,3	611,2	225,4	22,5	22,2	22,7	94,1	95,6	95,6	16,1	13,1	15,7
Agosto	156,4	161,7	115,9	22,8	22,8	22,9	92,7	92,7	94,5	18,7	18,9	17,7
Septiembre	118,0	130,0	260,1	23,0	22,6	23,3	92,5	93,2	93,9	18,1	18,8	18,9
Octubre	333,3	101,6	244,5	22,0	22,4	23,0	95,0	93,9	94,8	14,2	16,4	16,7
Noviembre	237,2	551,8	242,2	21,5	21,1	22,7	95,3	96,4	94,6	14,2	11,1	16,3
Diciembre	290,4	172,8	53,7	20,6	21,4	21,7	95,9	95,3	92,5	11,9	14,4	16,5
μ	228,3	219,9	162,1	22,0	21,9	22,3	93,0	93,7	93,7	16,9	16,6	17,0
S	126,8	173,9	93,9	1,0	1,0	0,8	2,0	1,4	1,3	2,6	2,6	1,1

Capacidad del *Azospirillum oryzae* PCJ1 de sustituir el fertilizante nitrogenado. Este segundo trabajo se realizó con la cepa PCJ1, debido a que en ambos años, obtuvo el rendimiento mayor en producción de biomasa (Cuadro 1). Según los resultados obtenidos, una dosis de 5 litros por hectárea de *A. oryzae* PCJ1 con una población mínima de 10^8 UFC.ml⁻¹, puede sustituir el 100% del fertilizante nitrogenado aplicado (Cuadro 3). De igual manera, se obtiene una reducción del 25% en la producción de forraje al comparar el año 2012 y el 2013 (Cuadro 1), resultados similares a los descritos por WingChing-Jones et al. (2013), producto de la disminución en precipitación.

DISCUSIÓN

La similitud en producción de la biomasa seca del pasto Estrella entre las parcelas tratadas con las cepas J1, J2

y la mezcla de las tres cepas; con la aplicación del fertilizante nitrogenado, se podrían asociar a la capacidad que presenta el género *Azospirillum* de generar una mayor elongación de la raíz y una mayor cantidad de pelos radicales (Bashan & de Baschan, 2010), lo cual le va permitir al cultivo aumentar la capacidad de absorber agua y nutrientes disponibles en la solución del suelo, debido a una mayor superficie de contacto radical. También, este efecto positivo en la producción del pasto Estrella africana, se puede relacionar a la producción de sustancias por parte de esta bacteria, como el ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA) (en menor cantidad), citocininas y giberilinas (Aguilar-Piedras, Xiqui-Vásquez, García-García & Baca, 2008).

Otro aspecto que se puede considerar en esta investigación es la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico que presenta este grupo de bacterias (Mehnaz, 2015). Por último, Bashan y de Baschan (2010), resumen 20 posibles

CUADRO 3
Respuesta a la aplicación de *Azospirillum oryzae*

Alternativa	Dosis aplicada del fertilizante nitrogenado (%)	Producción de forraje (t.ha ⁻¹)**	
		Base fresca	Base seca
<i>A. oryzae</i> . 5L/ha	0	13,57	2,93
	25	13,79	2,97
	50	14,43	3,10
	75	13,29	2,88
Sin aplicación	100*	14,21	3,08

*7 kg de nitrógeno por aparte por rotación. ** p>0,05.

beneficios de la relación *Azospirillum*-planta adicionales a los descritos en este trabajo los cuales incluyen efectos bactericidas, reguladores de pH, producción y uso de óxido nitroso; y formación de reguladores de crecimiento. Los resultados obtenidos se podrían relacionar a lo descrito por Martínez-Morales et al. (2003) y Viviene et al. (2004), donde indican que *Azospirillum*, por medio de su capacidad de fijar nitrógeno, facilita entre el 30 y 50% de los requerimientos totales de nitrógeno que requiere el cultivo para crecer; sumado a la producción de sustancias promotoras del crecimiento.

Según los resultados obtenidos, se infiere que las bacterias de *Azospirillum* lograron establecerse en la rizosfera del cultivo, alcanzando un mínimo de 10^6 - 10^7 células.planta⁻¹ debido a la respuesta positiva a la aplicación. Según Bashan et al. (2014), cuando los inoculantes se aplican al suelo su población disminuye de forma rápida, lo cual combinado con la pobre producción de biomasa microbiana, la dificultad de sostener actividad en la rizosfera y el estado fisiológico de la bacteria en el tiempo de aplicación, son condiciones que podrían condicionar que se encuentre una cantidad suficiente de bacterias en la rizosfera, a fin de mantener la respuesta positiva de la planta.

Es importante considerar en esta investigación que la fertilización nitrogenada se realizó en cada rotación durante los 24 meses de evaluación, lo que representa un total de 14 aplicaciones por año, mientras que los tratamientos biológicos, se aplicaron con menor frecuencia, al realizarse tres aplicaciones de *Azospirillum* spp. por año y una aplicación de vermicompost, lo que podría generar un ahorro sustancial en este rubro en la estructura de costos, con la meta de disminuir el costo de producción del kilo de materia seca del pasto Estrella Africana, que según Villalobos et al. (2013) para este forraje es de \$0,03 kg/MS (\$ 14,6 por kg/MS). Además, sin considerar el impacto al ambiente del efecto residual del fertilizante nitrogenado.

La reducción en la producción de biomasa se podría asociar a las condiciones climáticas que se presentaron durante el desarrollo del experimento donde la distribución de las lluvias generaron eventos extremos en precipitación, los cuales afectan la respuesta del crecimiento del forraje por problemas de pisoteo y generación de zonas con lodo. En el segundo caso, por la importancia del agua en la estabilidad del cultivo y suministro de nutrientes en el suelo. En este mismo sentido, WingChing-Jones et al. (2013) determinaron una disminución en el rendimiento por hectárea del pasto Estrella africana de 25%, al comparar la productividad del forraje del año

2012 con la del 2013, lo cual lo relacionaron a una disminución en la precipitación en la zona de estudio.

REFERENCIAS

- Aguilar-Piedras, J., Xiqui-Vásquez, M., Garcia-Garcia, S. & Baca, B. (2008). Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50, 29-37.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). (1998). Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed, 4th rev. Gaithersburg, MD: AOAC International, USA.
- Baldani, J.I., Krieg, N.R., Baldani, V.L.D., Hartman, A. & Dobereiner, J. (2005). Genus II *Azospirillum* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition, vol 2. The Proteobacteria. Part C. *The Alpha-Beta and Epsilon proteobacteria*, Benner, D.J., Kreig, N.R. and Staney, J.T. Eds. New York: Bergey's Manual Trust, pp. 7-26.
- Barassi, C.A., Sueldo, R.J., Creus, C.M., Carrozzi, L.E., Casanovas, E.M & Pereyra, M.A. (2007). *Azospirillum* spp., a dynamic soil bacterium favorable to vegetable crop production dynamic soil. *Dynamic Plant*, 1, 68-82.
- Bashan, Y. & de Baschan, L.E. (2010). How the plant grow promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth.-A critical assessment. *Advances in Agronomy*, 8, 77-136.
- Bashan, Y, de Basshan, L.E., Prabhu, S. R. & Hernández, J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 378,1–33
- Bhattacharya, P.N. & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura Review. *World J Microbiol Biotechnol*, 28,1327–1350.
- García-Olivares, J., Moreno-Medina, A V., Rodríguez-Luna, C., Mendoza-Herrera, A. & Mayek-Pérez, N. (2006). *Azospirillum brasilense* biofertilization in sorghum at northern México. *Agricultura Técnica en México*, 32 (2). 135-141.
- Giller, K.E. & Wilson, K.J. (1991). *Nitrogen fixation in tropical cropping systems*. CAB International. United Kingdom. pp. 19-20.
- Hungría, M., Campo, R. J., Souza, E. M. & Pedrosa, F.O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil*, 331, 413-425.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos, INEC. (2015). *VI Censo nacional agropecuario: Resultados generales/Instituto Nacional de Estadísticas y Censo*. -1ed- San José, Costa Rica. 146 p.
- Itzigsohn, R., Burdman, S., Okon, Y., Zaady, E., Yonatan, R. & Perevolotsky, A. (2000). Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Res. Rehab*, 13,151-158.

- Kapulnik, Y., Okon, Y., Kigel, J., Nur, I. & Henis, Y. (1981). Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). *Plant Physiol*, 68, 340-343.
- Kaymak, H. C. (2011). Potential of PGPR in agricultural innovations. pp. 45-79. In: *Plant growth and health promoting bacteria*. Springer Berlin Heidelberg.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A. & Kecskes, M.L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biological and Biochemistry*, 36,1229-1244.
- Martínez-Morales, L.J., Soto-Urzúa, L., Baca, B. E. & Sánchez, J. A. (2003). Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett*, 228(2),167-173.
- Mehnaz, S. (2015). *Azospirillum*. A biofertilizer for every crop. pp:297-314. Arora, N.K. (ed) *Plant microbes symbiosis: Applied facets*. DOI: 10.1007/978-81-322-2068-8.15. Springer India.
- Okon, Y. & Labandera-González, C. A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem*, 26, 1591-1601.
- Podile, A. R. & Kishore, G. K. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Plant-associated bacteria*. Springer Netherlands. p. 195-230.
- Ramírez, C., Soto, Z., Castro, L., Arauz, L.F., Uribe-Lorío L. & Uribe, L. (2015). Efecto de cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento sobre la pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile dulce (*Capsicum annum*). *Agronomía Costarricense*, 39(3), 87-100.
- SAS 2003. SAS 9.1.3. for Windows. Service Pack 4. Win_Pro plataforma. Copyright® 2002-2003 Cary NC.
- Salazar, S. (2007). *Disponibilidad de biomasa y valor nutricional del pasto Estrella africana (Cynodon nlemfuensis) en el distrito de Quesada, Cantón de San Carlos*. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 96 p.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A. & Netrusov, A. I. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42 (2),117-126.
- Umali-Garcia, M., Hubbell, D.H., Gaskins, M.H.&Dazzo, F.B. (1984). Adsorption and mode of entry of *Azospirillum brasilense* to grass roots, pp 49-62. In: P. Vose y A. Ruschel (eds.). *Associative N₂-Fixation. Volume I*. CRC Press. Florida.
- Veresolou, S.D. & Menexes, G. (2010). Impact of inoculation with *Azospirillum spp.* on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil*, 337, 469-480.
- Villalobos, L., Arce, J. & WingChing, R. (2013). Producción de biomasa y costos de producción de pastos estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*), kikuyo (*Kikuyuocloa clandestina*) y ryegrass perenne (*Lolium perenne*) en lecherías de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 37(2), 91-103.
- Vivienne, N., Matiru, F.D. & Dakora, S. (2004). Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *Afr. J. Biotechnol*, 3(1),1-7.
- WingChing-Jones, R., Villalobos, L., Arce, J. & Rojas, A. (2013). *Informe parcial proyecto de investigación 739-B2-082. Condiciones ambientales y producción de forraje del pasto Estrella Africana*. Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 6 p
- Xie, C.H. & Yokota, A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55,1435-1438.

