
**LOS BIOFERTILIZANTES INTEGRADOS CON BACTERIAS
FIJADORAS DE N, SOLUBILIZADORAS DE P Y SUSTRATOS
ORGÁNICOS EN EL CRECIMIENTO DE NARANJO AGRIO**

Citrus aurantium L.

María del Carmen Rivera-Cruz, Antonio Trujillo-Narcía y Daniel Eduardo Alejo Pereyra

RESUMEN

Se comparó la efectividad de la cáscara de naranja, la cachaza y el estiércol de pollo como acarreadores de consorcios constituidos por cepas de *Azospirillum*, *Azotobacter* y solubilizadoras de fósforo, y se determinó la dosis más eficiente de biofertilizante para un suelo cultivado con plantas de naranjo agrio (*Citrus aurantium*). Se evaluaron las respuestas de plantas, las propiedades químicas del suelo y las densidades bacterianas del suelo. El crecimiento de la planta aumentó con el incremento de las dosis aplicadas de los biofertilizantes con sustrato de cáscara de naranja (BIO1) y de cachaza (BIO2). En

el caso del fertilizante con sustrato de estiércol de pollo (BIO3) en dosis del 1% se incrementó la densidad poblacional de bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y solubilizadoras de P, así como el diámetro de tallo y el crecimiento de la planta, pero hubo efecto tóxico en la dosis del 3%, aún cuando los contenidos de carbono orgánico, N y P en suelo fueron mayores. Los tres biofertilizantes tienen potencial como inoculantes acarreadores de bacterias reguladoras de crecimiento vegetal, pero con el BIO3, que utiliza estiércol de pollo como acarreador, debe moderarse la dosis al aplicarla al suelo.

Introducción

El naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) es una planta de importancia en áreas tropicales del mundo debido a que el jugo se utiliza para preparar alimentos, dulces y bebidas refrescantes, y es utilizada como portainjer-

to de limón persa y naranja dulce. El aceite es utilizado en la industria, y particularmente en la de perfume. En México el área cultivada de esta especie es de 1410,5ha con una producción anual de 14554,3Tm (SIAP-SAGARPA, 2006). En el estado de Tabasco, el naranjo agrio se en-

cuentra en huertos familiares constituidos por pocas plantas y en huertas de cítricos con explotación comercial. Se le conserva por su uso como porta injerto en viveros. El sistema de producción en vivero, en maceta, es intensivo, con aplicaciones de fertilizantes inorgánicos al suelo y al

follaje, lo cual sin embargo produce dependencia tecnológica y económica (Melero *et al.*, 2007), ocasiona disminución de la materia orgánica y reducción de la capacidad de almacenamiento de agua en el suelo y de la estabilidad de la estructura del suelo, así como un incremento en

PALABRAS CLAVE / *Azotobacter* / *Azospirillum* / Biofertilizante / *Citrus aurantium* / Solubilizadoras de P /

Recibido: 25/02/2009. Modificado: 29/12/2009. Aceptado: 04/01/2010.

María del Carmen Rivera-Cruz. Ingeniera Agrónoma, Colegio Superior de Agricultura Tropical (CSAT), Cárdenas, Tabasco, México. Maestría y Doctorado en Ciencias en Edafología, Colegio de Postgradua-

dos (COLPOS), Montecillo, México. Profesora Investigadora, COLPOS, Tabasco, México. Dirección: Periférico Carlos A. Molina s/n km. 3.5, H. Cárdenas, Tabasco, México. e-mail: mariari@colpos.mx

Antonio Trujillo-Narcía. Ingeniero Agrónomo, CSAT, México. Maestría en Ciencias en Edafología, COLPOS, Montecillo, México. Profesor Investigador, Universidad Popular de la Chontalpa (UPCH), México.

Daniel Eduardo Alejo Pereyra. Ingeniero Agrónomo, UPCH, Tabasco, México. Estudiante de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico, COLPOS, Tabasco, México.

BIOFERTILIZERS INTEGRATED WITH N-FIXING AND P SOLUBILIZING BACTERIA, AND ORGANIC SUBSTRATES IN SOUR ORANGE *Citrus aurantium* L. GROWTH

María del Carmen Rivera-Cruz, Antonio Trujillo-Narcía and Daniel Eduardo Alejo Pereyra

SUMMARY

The effectiveness of orange peel, sugar cane filter cake, and chicken manure were compared in a consortium of carriers of strains of *Azospirillum*, *Azotobacter* and *P-solubilizer* bacteria, and the most efficient dose of biofertilizer was determined for a soil cultivated with sour orange trees (*Citrus aurantium*). Plant response, soil chemical properties and soil bacterial densities were evaluated. Plant growth increased with increasing doses of biofertilizers with orange peel substrate (BIO1) and filter cake (BIO2). In the case

of the biofertilizer with poultry manure substrate (BIO3) in doses of 1% the population density of bacteria of the genera *Azospirillum*, *Azotobacter* and *P solubilizers* increased, as did stem diameter and plant growth, but there was evidence of toxicity at the dose of 3%, even when the soil contents of organic C, N and P were higher. The three biofertilizers are potential carriers of plant growth promoting rhizobacteria, but with BIO3, using chicken manure as a carrier, the dose should be tempered when applying it to the soil.

OS BIOFERTILIZANTES INTEGRADOS COM BACTÉRIAS FIXADORAS DE N, SOLUBILIZADORAS DE P E SUBSTRATOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO DE LARANJA-AMARGA *Citrus aurantium* L

María del Carmen Rivera-Cruz, Antonio Trujillo-Narcía e Daniel Eduardo Alejo Pereyra

RESUMO

Comparou-se a efetividade da casca de laranja, a cachaça e o esterco de galinha como acarretadores de consórcios constituídos por cepas de *Azospirillum*, *Azotobacter* e solubilizadoras de fósforo, e foi determinada a dose mais eficiente de biofertilizante para um solo cultivado com plantas de laranja-amarga (*Citrus aurantium*). Avaliaram-se a resposta de planta, as propriedades químicas do solo e as densidades bacterianas do solo. O crescimento da planta aumentou com o incremento das doses aplicadas dos biofertilizantes com substrato de casca de laranja (BIO1) e de cachaça (BIO2). No caso de fertilizante

com substrato de esterco de galinha (BIO3) em doses de 1% se incrementou a densidade populacional de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter* e solubilizadoras de P, assim como o diâmetro de caule e o crescimento da planta, mas houve efeito tóxico na dose de 3%, mesmo quando os conteúdos de carbono orgânico, N e P em solo foram maiores. Os três biofertilizantes têm potencial como inoculantes acarretadores de bactérias reguladoras de crescimento vegetal, mas com o BIO3, que utiliza esterco de galinha como acarretador, deve moderar-se a dose ao ser aplicada no solo.

acidez y alcalinidad (Roldán *et al.*, 2005).

Los biofertilizantes basados en microorganismos rizosféricos son una alternativa emergente a los fertilizantes químicos inorgánicos para incrementar la fertilidad y producción de cultivos en agroecosistemas sustentables (Wu *et al.*, 2005). Las bacterias benéficas de vida libre son usualmente denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés; Kumar *et al.*, 2006). Las PGPR participan en diversos procesos del ecosistema, que incluyen el reciclaje y solubilización de nutrientes, establecimiento de plántulas, fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, control de patógenos de plantas, además de ser utilizados para propósitos forestales (Weller y Thomashow, 1993; Glick, 1995; Rodríguez y Fraga, 1999; Elo *et al.*, 2000; Vessey, 2003; Fuentes-Ramírez

y Caballero-Mellado, 2005). Las PGPR son componentes importantes en el agroecosistema porque no solo contribuyen en la disponibilidad de nutrientes que promueven el crecimiento vegetal, sino también en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono y energía (Gobat *et al.*, 2004). Además, favorecen la tasa de germinación, el crecimiento de las raíces, incrementa el contenido de proteínas, aumenta la tolerancia vegetal a factores que originan estrés y también funcionan como agentes de biocontrol (Glick, 2004; Bashan y de-Bashan, 2005).

El desarrollo de un inoculante involucra la selección de un sustrato que mantenga el crecimiento de las PGPR y que, al inocularlo en el suelo, las poblaciones de bacterias sean viables y altas. Un apropiado acarreador debe contener materia orgánica, óptimo contenido de N, ser barato y

no ser tóxico (Rivera-Cruz *et al.*, 2008). La incorporación al suelo de microorganismos en un material que funcione como acarreador debe garantizar su permanencia y la efectividad del biofertilizante en el suelo. Diferentes acarreadores de microorganismos han sido estudiados. Un grupo de ellos son los subproductos compostados de plantas y animales (Stephens y Rask, 2000), otro grupo son la semolina de arroz, estiércol de pollo y melaza (Okumoto, 2003), compostas de residuos de destilería, desechos de ganado bovino y gallinaza aplicados en una plantación de naranja (Intrigliolo *et al.*, 2004), estiércol de pollo en el crecimiento de plantas de maíz (Wu *et al.*, 2005), bagazo de molinos azucareros en el crecimiento de plantas de tomate (Meunchang *et al.*, 2006), estiércol de ganado bovino y vermicomposta en el cultivo de higuera (García-Cruz *et al.*,

2008), estiércol de puerco en el cultivo de lechuga (Lai *et al.*, 2008) y residuos de banana y estiércol de pollo en el crecimiento y desarrollo de plantas de banana enano (Rivera-Cruz *et al.*, 2008). Los efectos de los biofertilizantes en la planta se manifiestan en mayor crecimiento (Rajendran y Devaraj, 2004), elongación radicular y formación de biomasa vegetal (Acuña, 2003).

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de tipos y dosis de biofertilizantes que utilizan como acarreadores materiales orgánicos de tipo vegetal y animal, sobre la sustentabilidad del sistema suelo-planta. Se estudiaron las propiedades químicas del suelo, la densidad poblacional de bacterias en rizosfera-suelo y la promoción del crecimiento de la planta de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). La hipótesis de trabajo es que el estiércol de pollo y los residuos vegetales son efectivos acarreadores de

bacterias inoculadas en el suelo, contribuyendo a la sustentabilidad del cultivo de naranjo agrio en vivero.

Materiales y Métodos

Suelo

El suelo fue tomado de los horizontes superficiales Ap1 y Ap2 de un Acrisol vértico cutánico úmbrico, cultivado con plantación comercial de limón persa en el estado de Tabasco, México. Las coordenadas geográficas del sitio de muestreo son 17°43'11,17"N y 93°28'43,31"O. El suelo se secó bajo sombra y se molió. El suelo utilizado para el análisis químico se tamizó en mallas de 0,5 y 2mm, y el utilizado para establecer las plantas de naranjo agrio se tamizó en malla de 5mm. Las propiedades del suelo son pH 4,8 (potenciometría), C orgánico oxidable 3,43% (Walkley y Black, 1934) materia orgánica 5,9%, N_{total} 0,11% (micro Kjeldhal; Page *et al.*, 1982), P disponible 9,18mg·kg⁻¹ (NaHCO₃-extraíble; Olsen y Sommers, 1982) y K 7,1mg·kg⁻¹ (acetato de amonio 1N; Schollemberger y Simon, 1954).

Biofertilizantes

Los tres biofertilizantes, identificados como BIO1, BIO2 y BIO3, fueron elaborados con tres subproductos agrícolas orgánicos de la región y con tres cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de naranjo agrio injertadas con limón persa (Tabla I). Estas plantas están ubicadas en el mismo sitio de colecta del suelo. Las cepas son dos fijadoras de N de vida libre (*Azospirillum* sp (MTLS1-20) y *Azotobacter* sp (MTLS1-110)) y una bacteria solubilizadora de P (MTLS2-32). La cáscara de naranja, la cachaza y la pollinaza fueron secadas bajo sombra, molidas y tamizadas en malla de

TABLA I
COMPOSICIÓN DE LOS BIOFERTILIZANTES

Biofertilizante	Componentes
Testigo	Sin sustrato orgánico y sin inóculo
BIO1	Cáscara de naranja + <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp. + BSP.†
BIO2	Cachaza + <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp. + BSP.
BIO3	Estiércol de pollo + <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp. + BSP

† Bacterias solubilizadoras de fósforo.

TABLA II
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y DENSIDAD POBLACIONAL DE BACTERIAS EN LOS BIOFERTILIZANTES

Característica	Biofertilizante		
	BIO1	BIO2	BIO3
pH	3,7	8,4	6,3
Materia orgánica (%)	68,9	45,8	98,4
Carbono orgánico (%)	40,05	26,62	57,20
Nitrógeno total (%)	1,2	3,2	5,2
Fósforo disponible (mg·kg ⁻¹)	1450	2089	2869
Potasio (cmol(+)-kg ⁻¹)	0,34	16,9	34,58
<i>Azospirillum</i> sp (UFC ⁺ ·g ⁻¹ suelo seco)	11x10 ³	25x10 ⁴	48x10 ⁵
<i>Azotobacter</i> sp (UFC·g ⁻¹ suelo seco)	32x10 ³	24x10 ⁵	17x10 ⁵
Solubilizadora de P (UFC g ⁻¹ suelo seco)	11x10 ³	12x10 ⁵	26x10 ⁵

† Unidades formadoras de colonias.

BIO1: sustrato de cáscara de naranja, BIO2: sustrato de cachaza, BIO3: sustrato de estiércol de pollo.

2mm, y fueron esterilizadas en autoclave a 1,3kg·cm⁻¹ y 120°C durante 30min.

El inóculo de las tres bacterias fue preparado por separado en matraces de 0,5 l durante 78h en una incubadora con movimiento oscilatorio a 180rpm y 28°C. La cepa de *Azotobacter* fue cultivada en medio de cultivo líquido Ashby (5g manitol; 5g K₂HPO₄; 0,2g MgSO₄·7H₂O; 0,5g NaCl; 0,1g K₂SO₄; 5g CaCO₃, y 1,0 l de agua destilada, pH 7,0) según Rao (1999). La cepa de *Azospirillum* se cultivó en medio líquido D-Döbereiner (5g ácido málico; 0,5g K₂HPO₄; 0,2g MgSO₄·7H₂O; 0,1g NaCl; 0,5g extracto de levadura; 0,015g FeCl₃·6H₂O; 4,8g KOH; 15ml rojo congo; y 1,0 l agua destilada,

pH 7,0) según Holguín *et al.* (1996). La cepa de solubilizadora de P se estableció en medio de cultivo Pikovskaya's (10g glucosa; 5g Ca₃(PO₄)₂; 0,2g KCl; 0,5g (NH₄)₂SO₄; 0,1g MgSO₄·7H₂O; 0,5g extracto de levadura; 0,002g MnSO₄; pH 7,0) según Rao (1982). El tamaño inicial de la población de bacterias en el inóculo fue evaluado con el método de cuenta viable por dilución seriada (Madigan *et al.*, 2004), resultando 36·10⁶, 59·10⁶ y 89·10⁶ UFC·ml⁻¹ de *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp. y de la cepa solubilizadora de P, respectivamente. Los tres cultivos con las células bacterianas fueron transferidos a tubos estériles, se centrifugaron a 6000rpm a 28°C durante

TABLA III
CARACTERIZACIÓN DE TRATAMIENTOS DEL EXPERIMENTO

	Tratamiento									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Testigo (BIO)	Si	No								
Biofertilizante 1 (BIO1)†	No	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No
Biofertilizante 2 (BIO2)	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	No
Biofertilizante 3 (BIO3)	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si
Dosis de biofertilizante (%)	0	1	2	3	1	2	3	1	2	3

† BIO1: sustrato de cáscara de naranja, BIO2: sustrato de cachaza, BIO3: sustrato de estiércol de pollo.

15min. Las células se resuspendieron en 280ml de agua estéril en cada 1000g de soporte orgánico esterilizado (cáscara de limón, cachaza o pollinaza) dentro de bolsas de polietileno desinfectadas y se incubaron a 28°C durante 60 días. Las propiedades químicas y las poblaciones de bacterias de cada biofertilizante se especifican en la Tabla II.

Establecimiento del experimento y variables evaluadas

Los efectos de los tipos y dosis de biofertilizantes fueron evaluados en las propiedades físico-químicas del suelo, en la densidad de población de bacterias, en el crecimiento (altura de planta y diámetro de tallo) y en la biomasa radical y aérea de la planta. El experimento consistió de 10 tratamientos y seis repeticiones cada uno; en total fueron 60 unidades (Tabla III). Los niveles de fertilización fueron 0, 1, 2 y 3%; se adicionó 0, 10, 20 y 30g de biofertilizante, respectivamente, por kg de suelo seco. Cada unidad experimental consistió de 4kg de suelo seco más la planta de naranja criolla, con su respectivo tipo y nivel de biofertilizante. La planta fue trasplantada dos meses después de la emergencia de la plántula, siendo la altura promedio de la planta al momento de la siembra de 4,2 ± 0,34cm.

Crecimiento y biomasa vegetal

La altura de la planta se midió cada tres meses hasta los 12 meses, desde la base del tallo hasta el primordio foliar, utilizando una regla graduada en cm. Las plantas fueron cosechadas a los 12 meses después de la siembra, se separaron la raíz y la parte aérea, se introdujeron en bolsas de papel y se secaron en horno a 72°C durante 72h.

TABLA IV
PROPIEDADES QUÍMICAS EN RIZOSFERA DE SUELO CULTIVADO CON NARANJO AGRIO EN RESPUESTA A DIFERENTES TIPOS Y DOSIS DE BIOFERTILIZANTES A LOS 12 MESES DESPUÉS DEL TRASPLANTE

Tratamiento	C org (%)	N total (%)	C/N	P disponible (mg·kg ⁻¹)
Testigo (0%)	3,2 a [†]	0,216 a	15,1	16,56 a
BIO1 (1%)	5,09 b	0,220 a	23,3	16,43 a
BIO1 (2%)	6,08 ef	0,223 ab	26,0	16,63 a
BIO1 (3%)	6,03 ef	0,253 b	23,8	16,43 a
BIO2 (1%)	5,16 bcd	0,246 ab	20,9	30,20 b
BIO2 (2%)	5,26 bcd	0,236 ab	22,2	36,10 c
BIO2 (3%)	5,54 cde	0,233 ab	23,77	36,80 c
BIO3 (1%)	5,26 bcd	0,266 b	19,77	49,30 d
BIO3 (2%)	5,46 cd	0,320 c	11,06	57,40 e
BIO3 (3%)	6,21 f	0,330 c	18,81	98,40 f

[†] Valores con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey; p<0,05; a<b; n=6). BIO1: sustrato de cáscara de naranja, BIO2: sustrato de cachaza, BIO3: sustrato de estiércol de pollo.

Conteo de microorganismos en rizosfera y en suelo a distancia

El conteo y el aislamiento de las poblaciones de bacterias se realizó en muestras frescas de suelo rizosférico y de suelo a distancia colectadas al momento de la cosecha. Se utilizó la técnica de dilución seriada (Madigan *et al.*, 2004). Los medios utilizados en cajas Petri fueron cultivo líquido Ashby para *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp se cultivó en medio líquido D-Döbereiner y la solubilizadora de P en el medio Pikovskaya's.

Determinación de N y P en suelo de macetas

La determinación de N total y de P disponible en suelo se realizó en muestras colectadas a los 12 meses después de la siembra de la planta. El suelo se secó bajo sombra, se tamizó en mallas de 0,5 y 2mm de abertura. El N total se analizó por el método micro-Kjeldahl, tras digerir la muestra con H₂SO₄ (Page *et al.*, 1982). El P disponible se determinó mediante el método Olsen con solución extraíble de NaHCO₃ utilizando un espectrofotómetro a 882 nm (Olsen y Sommers, 1982).

Análisis de datos

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para cada

variable, y la comparación de medias fue mediante la prueba de Tukey (p<0,05). El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS para Windows versión 12 (Camacho, 2006).

Resultados y Discusión

C orgánico, N total y P disponible en suelo

Los tres suelos con biofertilizantes tuvieron mayores contenidos de C orgánico, N total y P disponible que el suelo testigo (Tabla IV), con diferencias estadísticas significativas para los tres elementos. La cantidad de C orgánico muestra tendencia creciente dentro de cada acarreador de PGPR utilizado y también entre los tres acarreadores. El suelo con mayor contenido de C orgánico (6,21%) fue el enmendado con estiércol de pollo (pollinaza) como acarreador de PGPR (BIO3) en dosis del 3%, que resultó 94% mayor comparado con el suelo testigo. Los tres acarreadores utilizados (Tabla I) aumentaron los niveles de C en el suelo, lo cual incrementa la fertilidad, de modo que los microorganismos del suelo pueden utilizarlo como fuente energética. Resultados similares fueron obtenidos con residuos orgánicos de origen animal (Meijide *et al.*, 2007) y vegetal (Shafi *et al.*,

2007); en ambos trabajos se encontraron mayores niveles de C orgánico, con diferencias estadísticas respecto al suelo no enmendado. Valores altos de C mineralizable han sido reportados en suelos enmendados con compostas de residuos de destilería y de desechos de ganado, asociados con materia orgánica fácilmente degradable por la microflora del suelo (Intrigliolo *et al.*, 2004). El N total también evidenció diferencias estadísticas significativas (Tabla IV) entre los contenidos medios de los tres acarreadores de las diferentes bacterias. El suelo enriquecido con 2 y 3% de estiércol de pollo (BIO3 2% y BIO3 3%) tuvo la mayor cantidad de N total con 0,32 y 0,33%,

En cuanto al P disponible, la mayor cantidad (98,4mg) se halló en el biofertilizante BIO3 3%, siendo cinco veces mayor que el determinado en el suelo testigo. Destaca que el BIO1, constituido de cáscara de naranja, contiene cantidades estadísticamente similares que el testigo (Tabla IV). Las dosis y las interacciones entre los dos factores revelan efectos significativos en los contenidos de N total en el suelo, P disponible y cantidad de C orgánico (Tabla V).

Densidad de bacterias en rizosfera y en suelo a distancia

Al cuantificar la densidad de las bacterias diazotrófi-

TABLA V
ANOVA DE DOS FACTORES (TIPO DE BIOFERTILIZANTE Y DOSIS DE BIOFERTILIZANTE) PARA TODOS LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS EN SUELO RIZOSFÉRICO DE NARANJO AGRIO A LOS 12 MESES DESPUÉS DEL TRASPLANTE

	Biofertilizante (B)	Dosis (D)	Interacción (BxD)
Altura de planta	0,145	0,002	0,000
Biomasa radical	0,000	0,000	0,000
Biomasa follaje (aérea)	0,000	0,000	0,000
Biomasa total	0,000	0,000	0,000
Diámetro de tallo	0,002	0,000	0,000
<i>Azospirillum</i> sp	0,000	0,000	0,000
<i>Azotobacter</i> sp	0,000	0,000	0,000
Solubilizadora de P	0,000	0,000	0,000
N total en suelo	0,000	0,000	0,000
P disponible en suelo	0,000	0,000	0,000
Carbono orgánico	0,749	0,000	0,102
Potencial hidrógeno	0,991	0,845	0,897
Conductividad eléctrica	0,991	0,845	0,897

ambos fueron similares estadísticamente, y con 53% mayor cantidad que el promedio del suelo testigo (0,216%). Según Wu *et al.* (2005) la aplicación de fertilizante orgánico incrementa el contenido de N en el suelo, lo cual puede ser atribuido no solo al N sino también al C orgánico contenido en el fertilizante. Wani *et al.* (1988) mencionan que el uso adecuado de abonos de corral de una granja, abonos verdes y otros abonos orgánicos y fertilizantes puede aumentar los beneficios de la inoculación de *Azotobacter*, influyendo en la fijación biológica de N.

cas PGPR en la rizosfera y en el suelo a distancia de la planta de naranjo agrario se identificaron medias con diferencias estadísticas significativas (Tabla VI), encontrándose efecto de dosis e interacciones de factores (Tabla V). El biofertilizante BIO3 1% promovió las mayores densidades poblacionales de *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y de BSP (Tabla VI), pero en concentraciones de 2 y 3% inhibió la población de las tres bacterias. La concentración 3% disminuyó severamente la cantidad de UFC, del orden de 25 veces en *Azos-*

pirillum y 42 veces tanto en *Azotobacter* como en las BSP. La causa posible se asocia con altos contenidos de N que pueden resultar dañinos para las bacterias, sobre todo porque durante los 360 días de duración del experimento el suelo liberó olor de amoniaco. Niveles altos de N de urea, con o sin fertilizante orgánico (estiércol de puerco) aplicado en el suelo, inhiben el crecimiento de las poblaciones de bacterias (Lai *et al.*, 2008). El tamaño de la población de las rizobacterias inoculadas varía de acuerdo con los niveles de fertilización y de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la rizosfera. El nivel bajo de fertilización conjuntamente con el inóculo de rizobacterias, con turba que acarreador y con micorriza, indujeron las comunidades más grandes de *Azotobacter chroococcum* en la rizosfera. La propagación de esta bacteria fue severamente inhibida cuando el N-amonio excedió $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Wu *et al.*, 2005).

El efecto de la rizosfera se observa en la Figura 1. La mayor densidad de las tres bacterias se localizó en rizosfera respecto a suelo a distancia tanto en tratamiento testigo como en los tres biofertilizantes. Una mayor densidad de microorganismos alrededor de la raíz respecto al suelo a distancia ha sido reportado en diferentes trabajos (Wu *et al.*, 2005; Manoharachary y Mukerji, 2006; Meunchang *et al.*, 2006), debida a que se depositan compuestos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos, nucleótidos, flavonoides, enzimas, glucósidos, auxinas, sapónicos y taninos

TABLA VI
CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE BACTERIAS EN SUELO RIZOSFÉRICO DE NARANJO AGRIO POR EFECTOS DE TIPOS Y DOSIS DE BIOFERTILIZANTES A LOS 12 MESES DESPUÉS DEL TRASPLANTE

Tratamientos	<i>Azospirillum</i> sp	<i>Azotobacter</i> sp	Solubilizadora de P
	(10^3)	(10^3)	(10^3)
	UFC·g ⁻¹ rizosfera seca		
Testigo (0%)	0,28 ±59,9 a [†]	2,0 ±8,4 a	2,8 ±22,1 a
BIO1 (1%)	1,6 ±38,0 b	12,5 ±7,4 c	8,6 ±32,0 b
BIO1 (2%)	0,87 ±16,0 a	4,6 ±15,6 b	2,6 ±8,6 a
BIO1 (3%)	9,1 ±84,0 e	2,3 ±18,3 ab	12,9 ±4,6 b
BIO2 (1%)	8,3 ±6,5 d	16,3 ±5,8 d	15,1 ±3,8 c
BIO2 (2%)	3,1 ±6,6 c	2,0 ±45,0 ab	23,8 ±2,7 d
BIO2 (3%)	2,7 ±19,9 c	16,5 ±0,4 d	22,1 ±6,8 d
BIO3 (1%)	10,9 ±17,7 f	30,0 ±24,5 f	93,12 ±3,2 e
BIO3 (2%)	3,4 ±40,6 c	24,0 ±0,4 e	2,0 ±19,0 a
BIO3 (3%)	0,43 ±2,9 a	0,7 ±0,6 a	2,2 ±6,7 a

[†] Valores con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey; $p < 0,05$; $a < b$; $n = 6$). BIO1: sustrato de cáscara de naranja, BIO2: sustrato de cachaza, BIO3: sustrato de estiércol de pollo.

(Gupta y Mukerji, 2002), los cuales tienen un efecto selectivo sobre los microorganismos. El BIO3 demostró

potencial para estimular una mayor densidad de las tres bacterias en suelo cultivado con naranjo agrio.

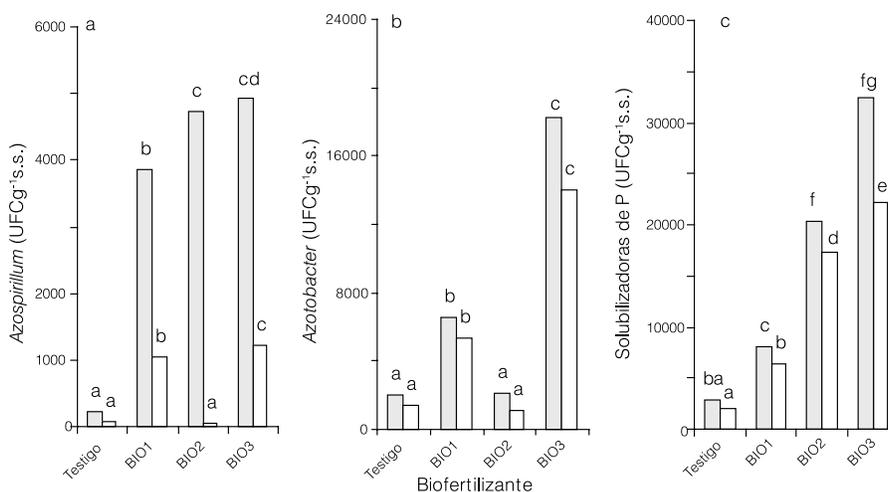


Figura 1. Población de bacterias en rizosfera de naranjo agrio y suelo según el tipo de biofertilizante inoculado a los 12 meses después del trasplante. a) *Azospirillum* sp, b) *Azotobacter* sp, c) solubilizadoras de P. Rizosfera (□) y suelo a distancia (◻). (Tukey, $p < 0,05$, $a < b$, $n = 6$). BIO1: sustrato de cáscara de naranja, BIO2: sustrato de cachaza y BIO3: sustrato de estiércol de pollo.

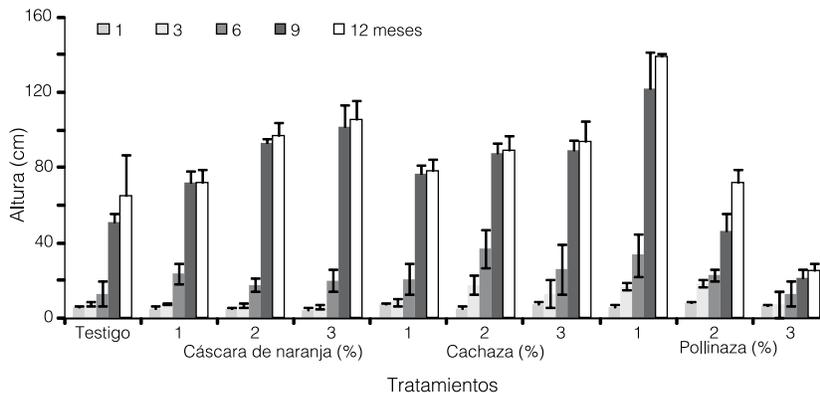


Figura 2. Variación en el crecimiento de la planta de naranjo agrio por efecto de tipo de biofertilizante y dosis en cinco tiempos sucesivos hasta los 12 meses después del trasplante (Tukey; $p < 0,05$; $a < b$; $n = 6$).

Crecimiento y acumulación de biomasa vegetal

La Figura 2 muestra los cambios de la altura de la planta de naranjo agrio durante 12 meses. Se observa que a los tres meses la planta fue estadísticamente igual en todos los tratamientos. Esta ausencia de respuesta posiblemente se debe a que la raíz de la planta aún no alcanzaba a ponerse en contacto con el biofertilizante que fue enterrado a 10cm de profundidad en el suelo. Las diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0,05$) fueron notorias a partir del sexto mes. Los biofertilizantes BIO1 y BIO2 mostraron crecimiento directamente

proporcional a la cantidad adicionada, en cambio la altura fue inhibida por 2 y 3% de pollinaza (BIO3), que disminuyó hasta cinco veces respecto al 1%. Este efecto tóxico puede ser debido a las altas cantidades de N en el suelo, lo cual es sabido puede ser un factor de estrés. Esta respuesta puede deberse a que la planta responde positiva o negativamente a condiciones de estrés que pueden provenir por cambios en temperatura, pH, cantidades tóxicas de elementos minerales y orgánicos en suelo (Salisbury y Ross, 2000), que fueron ocasionados por el estiércol de pollo, sustrato del BIO3, pero no por la cáscara de naranja y la cachaza (sustratos de BIO1 y BIO2).

Al momento de la cosecha de la planta (día 360), el tipo de biofertilizante, las dosis y la interacción entre ambos factores presentaron efectos significativos en día-

metro de tallo, biomasa radical, aérea y total (Tablas V y VII). Estos parámetros aumentaron cuando se incrementó la dosis de los biofertilizantes BIO1 y BIO2, pero disminuyeron en el caso del incremento de la dosis del BIO3. Las dosis del 2 y 3% de BIO3 indujeron respuesta negativa en estos parámetros, lo que demuestra la alta sensibilidad de la planta de naranjo agrio a este acarreador. Estudios realizados en banano sometido a estiércol de pollo como acarreador, en dosis de 1, 2, 3 y 4% no presentaron la misma respuesta (Rivera-Cruz *et al.*, 2008); por el contrario hubo una respuesta positiva de las cuatro dosis en la planta.

Los beneficios observados en el crecimiento de la planta por la aplicación de dosis de biofertilizantes son del suplemento de nutrientes disponible en el suelo. El N total y el P disponible aumentaron con la adición de los tres biofertilizantes (Tabla IV). Las altas dosis del BIO2 (preparado con cachaza) incrementaron 7,29% en N total y 55% el P disponible, lo cual permite un buen desarrollo de la planta. Sin embargo, al aumentar la dosis de BIO3, el incremento de 34,5% de N total y 83,17% de P disponible respecto al suelo testigo pudo inducir efectos tóxicos que se manifestaron en el desarrollo de la planta. Sin embargo, la biomasa total presenta una relación altamente significativa entre

TABLA VII
EFECTOS DE TIPOS Y DOSIS DE BIOFERTILIZANTES EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASAS AÉREA, RADICAL Y TOTAL DE PLANTA DE NARANJO AGRIO A LOS 12 MESES DESPUÉS DEL TRASPLANTE

Tratamiento	Diámetro tallo (mm)	Biomasa aérea (g peso seco)	Biomasa radical (g peso seco)	Relación biomasa aérea/radical	Biomasa total (g peso seco)
Testigo (0%)	6,91 b [†]	10,4 c	8,8 c	1,18	19,20 c
BIO1 (1%)	7,46 bc	20,3 d	22,6 d	0,89	42,9 d
BIO1 (2%)	8,12 bc	31,9 g	23,5 e	1,35	55,4 e
BIO1 (3%)	8,16 bc	34,7 h	27,8 g	1,24	62,5 h
BIO2 (1%)	7,84 bc	20,3 d	35,9 i	0,56	56,2 f
BIO2 (2%)	7,96 bc	29,7 f	27,8 g	0,83	57,7 g
BIO2 (3%)	8,87 b	26,9 e	35,8 h	0,75	62,9 i
BIO3 (1%)	10,53 c	38,7 i	26,4 f	1,46	65,1 j
BIO3 (2%)	6,98 b	6,2 b	3,1 b	2,0	9,3 b
BIO3 (3%)	2,60 a	0,8 a	0,5 a	1,6	1,3 a

[†] Valores con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey; p<0,05; a<b; n=6).

BIO1: sustrato de cáscara de naranja, BIO2: sustrato de cachaza, BIO3: sustrato de estiércol de pollo.

los contenidos de N total y P disponible en suelo (Tabla VIII). Así mismo, se presentó una alta relación entre los contenidos de P y la densidad de BSP. Estas bacterias degradan elementos lignocelulósicos localizados en los acarreadores y excretan ácidos orgánicos que incrementan los contenidos de P en la solución del suelo por mecanismos de quelación y reacciones de intercambio (Vessey 2003). En el presente estudio la densidad de BSP fue alta en los suelos enmendados con estiércol de pollo al 1% (Tabla VI). En contraste, el N total en suelo no se correlacionó con la densidad de *Azospirillum* y *Azotobacter*, pero sí con la biomasa de raíz, foliar y total (Tabla VIII). Estas bacterias, según Nehl y Knox (2006), incrementan el crecimiento de la planta por la fijación de N atmosférico en la rizosfera, que puede ser asimilado por

las plantas debido a que lo retienen en forma de amonio y lo transfieren directamente

Conclusión

La adición de las cepas de bacterias *Azospirillum*, *Azotobacter* y solubilizadoras de P, usando residuos vegetales (cáscara de naranja y cachaza) y estiércol de pollo como acarreadores, estimularon el crecimiento de *Citrus aurantium* bajo condiciones de vivero. La efectividad de los biofertilizantes integrados con residuos vegetales y estiércol de pollo se relacionó con su potencial para soportar el crecimiento y supervivencia de bacterias fijadoras de N y solubilizadoras de P, con una subsecuente disponibilidad de N y P en suelo. Las dosis de 2 y 3% del BIO3 (estiércol de pollo) resultaron no efectivas para el crecimiento de la planta y de las bacterias, pero sí para

las propiedades químicas del suelo que se correlacionaron con las dosis aplicadas. Las dosis de 3% de los BIO1 y BIO2 (con cáscara de naranja y cachaza como acarreadores de bacterias reguladoras de crecimiento vegetativo) pueden ser utilizadas para enmendar suelos cultivados con *Citrus aurantium*, pero el uso de estiércol de pollo como acarreador queda restringido a la dosis de 1%.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Mixto CONACYT - Gobierno del Estado de Tabasco, México, el financiamiento a través del proyecto TAB-2005-C06-16416 "Desarrollo de sistema de fertilización orgánica para el cultivo de limón persa (*Citrus aurantium* L.) en Huimanguillo, Tabasco".

REFERENCIAS

- Acuña O (2003) El uso de biofertilizantes en la agricultura. En Meléndez G, Soto G (Eds.) *Taller de Abonos Orgánicos*. CANIAN/GTZ/UCR/CATIE. Sabánilla, Costa Rica. pp. 1-9.
- Bashan Y, de-Bashan LE (2005) Bacteria/Plant growth-promotion. En Hillel D (Ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Vol. I. Elsevier. Oxford, RU. pp. 103-115.
- Camacho RJ (2006) *Estadística con SPSS para Windows*. Versión 12. 1ª ed. Alfaomega. México. 410 pp.
- Elo S, Maunukela L, Salkinoja-Salonen M, Smolander A, Atela K (2000) Humus bacteria of Norway spruce stands: plant growth promoting properties and birch, red fescue and alder colonizing capacity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 143-152.
- Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J (2005) Bacterial biofertilizers. En Siddiqui ZA (Ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Holanda. pp. 143-172.
- García-Cruz A, Flores-Román D, García-Calderón NE, Ferrera-Cerrato R (2008) Efecto de enmiendas orgánicas, higuera

TABLA VIII
CORRELACIÓN DE VARIABLES

Variable	Biomasa raíz	Biomasa follaje	Biomasa total	Diámetro tallo	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	BSP	N total	P disponible
Altura	0,549*	0,824*	0,724*	0,879*	0,615*	0,595*	0,643*	N,S	0,514*
Biomasa raíz		0,792*	0,947*	0,661*	0,427*	0,453*	0,974*	0,615*	0,514*
Biomasa follaje			0,820*	0,591*	0,300	0,639*	0,845*	NS	0,547*
Biomasa total				0,766*	0,563*	0,577*	0,961*	0,513*	0,593*
Diámetro tallo					0,582*	0,572*	0,740*	0,483*	0,643*
<i>Azospirillum</i>						0,992*	0,546*	N,S	NS
<i>Azotobacter</i>							0,555*	N,S	NS
Solubilizadoras P								0,561*	0,472*
N total									0,813*

* Con diferencias altamente significativas. NS: no significativo.

- y micorriza sobre las características de un tepetate. *Terra Latinoam.* 26: 309-315.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- Glick BR (2004) Bacterial ACC-deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 56: 291-312.
- Gobat J-M, Aragno M, Matthey W (2004) *The Living Soil. Fundamentals of Soil Science and Soil Biology.* Science Publishers. Enfield, NH, EEUU. 602 pp.
- Gupta R, Mukerji KG (2002) Root exudate biology. En Mukerji KG, Manoharachary C, Chamola BP (Eds.) *Techniques in Mycorrhizal Studies.* Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp. 103-131.
- Holguín G, Bashan Y, Ferrera-Cerrato R (1996) Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas. *Terra* 14: 211-224.
- Intrigliolo F, Pompili L, Nisini L, Mocali S, Torrisi B (2004) Effect of long term addition of composts and poultry manure on soil quality of citrus orchards in Southern Italy. *Biol. Fertil. Soils* 40: 206-210.
- Kumar SA, Shender R, Grover M (2006) Interaction Among Beneficial Microorganisms. En Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J (Eds.) *Microbial Activity in the Rhizosphere.* Springer. Berlín, Alemania. pp. 121-132.
- Lai W-A, Rekha PD, Arun AD, Young C-C (2008) Effect of mineral fertilizer, pig manure, and *Azospirillum rugosum* on growth and nutrient contents of *Lactuca sativa* L. *Biol. Fertil. Soils* 45: 155-164.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2004) *Brock. Biología de los Microorganismos.* 10ª ed. rev. Pearson. Madrid, España. 1096 pp.
- Manoharachary C, Mukerji GK (2006) Rhizosphere biology-an overview. En Mukerji GK, Manoharachary C, Singh J (Eds.) *Microbial Activity in the Rhizosphere.* Springer. Berlín, Alemania. pp. 1-15.
- Meijide A, Díez AJ, Sánchez-Martín L, López-Fernández S, Vallejo A (2007) Nitrogen oxide emissions from an irrigated maize crop amended with treated pig slurries and composts in a Mediterranean climate. *Agric. Ecosyst. Env.* 121: 383-394.
- Melero S, Madejon E, Ruis JC, Herencia JF (2007) Chemical and biochemical properties of a clay soil under dryland agriculture system as affected by organic fertilization. *Eur. J. Agron.* 26: 327-334.
- Meunchang S, Panichsakpatana S, Weaver RW (2006) Tomato growth in soil amended with sugar mill by-products compost. *Plant Soil* 280: 171-176.
- Nehl DB, Knox GGO (2006) Significance of bacteria in the rhizosphere. En Mukerji GK, Manoharachary C, Singh J (Eds.) *Microbial Activity in the Rhizosphere.* Springer. Berlín, Alemania. pp. 89-119.
- Okumoto S (2003) Uso de inoculante microbiano para la elaboración de abono orgánico. En Meléndez G, Soto G (Eds.) *Taller de Abonos Orgánicos.* CANIAN/GTZ/UCR/CATIE. Sabanilla, Costa Rica. pp. 52-61.
- Olsen SR, Sommers LE (1982) Phosphorus. En Page, AL, Miller RH, Keeny DR (Eds.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* 2ª ed. ASA/SSSA. Madison, WI, EEUU. pp. 403-430.
- Page AL, Miller RH, Keeny DR (1982) Nitrogen total. En Page AL, Miller RH, Keeny DR (Eds.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* 2ª ed. ASA. SSSA. Madison, WI, EEUU. pp. 595-629.
- Rajendran K, Devaraj P (2004) Biomass and nutrient distribution and their return of *Casuarina equisetifolia* inoculated with biofertilizers in farm land. *Biomass Bioenergy* 26: 235-249.
- Rao NS (1982) *Biofertilizers in Agriculture.* Oxford/IBH. Nueva Delhi, India. 186 pp.
- Rao NS (1999) *Soil Microorganisms and Plant Growth.* Oxford/IBH. Nueva Delhi, India. 407 pp.
- Rivera-Cruz MC, Trujillo-Narcía A, Córdova BG, Kohler J, Caravaca F, Roldán A (2008) Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carrier for promoting plant growth and soil sustainable in banana crops. *Soil Biol. Biochem.* 40: 3092-3095.
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- Roldán A, Salinas-García JR, Alguacil MM, Díaz E, Caravaca F (2005) Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. *Geoderma* 129: 178-185.
- Schollemberger CJ, Simon RH (1954) Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil. *Soil Sci.* 59: 13-24.
- Salisbury FB, Ross CW (2000) *Fisiología de las Plantas I. Célula: Agua, Soluciones y Superficies.* Paraninfo/Thomson. Madrid, España. 305 pp.
- Shafi M, Bakht J, Tariq JM, Shah Z (2007) Soil C and N dynamics and maize (*Zea mays* L.) yield as affected by cropping systems and residue management in North-western Pakistan. *Soil Till. Res.* 94: 520-529.
- SIAP-SAGARPA (2006) Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta 1980-2006 (SIACON), México DF. www.siapasagarpa.gob.mx
- Stephens JHG, Rask HM (2000) Inoculant production and formulation. *Field Crop Res.* 65: 249-258.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Walkley A, Black IA (1934) An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38.
- Wani SP, Chandrapalaiah S, Zambre MA, Lee KK (1988) Association between N₂-fixing bacteria and pearl millet plants. Response, mechanisms and resistance. *Plant Soil* 110: 284-302.
- Weller DG, Thomashow LS (1993) Use of rhizobacteria for biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 306-311.
- Wu SC, Cao ZH, Li ZG, Cheung MKC, Wong WH (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125: 155-166.