

Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia

Non-symbiotic bacterial diazotrophs from of agricultural crops of San Carlos. Córdoba, Colombia

Cecilia Lara Mantilla¹, Mara Villalba Anaya², Luis Eliécer Oviedo Zumaqué³

Resumen

Se aislaron bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* a partir de la rizosfera de cultivos de plátano, pastos, maíz y de rastrojos (zonas sin cultivar) en el municipio de San Carlos (Valle del Sinú medio en el departamento de Córdoba, Colombia). Las poblaciones microbianas se identificaron mediante pruebas bioquímicas y observación macroscópica y microscópica con tinción de Gram en diferentes medios de cultivo: a) Burk's, Ashby y Jensen's, (género *Azotobacter sp*), y b) Burk's, NFB y rojo congo (género *Azospirillum sp*). El objetivo del presente trabajo fue determinar la producción del ión amonio a partir de los géneros bacterianos aislados; la cuantificación del ión amonio fue llevada a cabo por el método colorimétrico de Berthelot (fenol-hipoclorito) empleando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 11 UV-Vis; la técnica fue modificada y estandarizada de acuerdo con las condiciones del equipo. Como resultado se obtuvieron 14 aislados que produjeron concentraciones de 0,9 hasta 5,2 mg/l, siendo los más destacados para el género *Azotobacter sp*, A16PG y A26MIP (5,1545 y 5,1743 mg/l de amonio, respectivamente), y para el género *Azospirillum spp*, A5M1G (4,6741 mg/l de amonio). La fijación biológica del nitrógeno (FBN) por bacterias diazotróficas ha contribuido a incrementar el rendimiento en las cosechas, reduciendo la necesidad de fertilizantes nitrogenados y la emisión de gases tóxicos como el N₂O, obteniendo beneficios económicos y ambientales en las granjas.

Palabras clave: método de Berthelot, ión amonio, *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*.

Abstract

Diazotrophic *Azotobacter sp* and *Azospirillum sp* bacteria were isolated from the rhizosphere of plantain, (*Musa paradisiaca*), corn, wheat and fallow areas (uncultivated, but covered by fallen leaves) in the San Carlos region (in the Sinú valley in the Córdoba department, Colombia). Microbial populations were identified by biochemical tests; physiological characters were examined using Gram reaction in different mediums: Burk's, Ashby and Jensen's (*Azotobacter sp*) and Burk's, NFB and Congo-red medium (*Azospirillum sp*). The study was aimed at determining ion ammonium production from *Azotobacter sp* and *Azospirillum sp* isolates; ion ammonium was quantified

1 Química, M.Sc., Ph.D. Directora del Grupo de Biotecnología Departamento de Química (Grubiodeq), Universidad de Córdoba, km. 3 vía Cereté. Montería, Córdoba, Colombia. clara@sinu.unicordoba.edu.co

2 Química, Grupo de Biotecnología Departamento de Química (Grubiodeq), Universidad de Córdoba.

3 Licenciado en biología y química, ingeniero agrónomo, especialista en manejo de suelos y aguas. MS.C. en Microbiología.

according to Berthelot's colorimetric technique (phenol-hypochlorite). This method was modified and standardised in line with using a Perkin-Elmer Lambda 11 UV-Vis spectrometer. As a result of this study, 14 isolates have been shown to be ammonium-producers at concentrations ranging from 0.9 mg/l to 5.2 mg/l; A16PG (5.1545 mg/l) and A26M₁P (5.1743 mg/l) yielded the highest ammonium concentrations for *Azotobacter sp* and A5M₁G (4.6741 mg/l) for *Azospirillum sp*. Biological N₂ fixation (BNF) by associative diazotrophic bacteria has contributed towards increasing harvest yield, thereby reducing the need for nitrogenised fertilisers and the emission of greenhouse gases (such as N₂O) and obtaining economic and environmental benefits for farming.

Key words: Berthelot method, ion ammonium, *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*.

Recibido: Febrero 20 de 2007

Aceptado: Agosto 31 de 2007

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno molecular (N₂) que existe en la atmósfera no es fácilmente asimilable por los vegetales debido a que el triple enlace que une los átomos que forman la molécula es difícil de romper; la única forma de aprovechar el nitrógeno atmosférico es mediante el proceso metabólico conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), el cual asegura la disponibilidad de nitrógeno en los ecosistemas naturales (Zuberer, 1998). El proceso es llevado a cabo por ciertos microorganismos del suelo que se conocen como "microorganismos fijadores de nitrógeno"; todos los microorganismos que convierten el nitrógeno (N₂) en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático llamado nitrogenasa que está constituido por dos metaloproteínas: la proteína (I), llamada hierro-molibdeno-proteína, y la proteína (II), llamada hierro-proteína (Baca et ál, 2000); la enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas: ferredoxina y flavodoxina, que actúan como donadores de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa. Los electrones son transportados a la nitrogenasa por la ferredoxina y llegan a la hierro-proteína, ésta activa a la Mo-Fe-proteína y se produce la reducción de nitrógeno, siendo luego fijado como compuesto aminado (Hernández, 1998).

Reacción de la FBN:



Los microorganismos fijadores de nitrógeno incluyen dos variantes: los fijadores simbióticos que fijan nitrógeno en asociación con plantas, y los no simbióticos (asimbióticas) o de vida libre que proporcionan al medio compuestos nitrogenados como amonio, aprovechados por los vegetales (Hernández, 1998; Zuberer, 1998). Numerosas bacterias de los géneros *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*, *Pseudomonas sp*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp* son eficientes fijadoras asimbióticas de nitrógeno contribuyendo sustancialmente a que los agricultores economícen en fertilizantes nitrogenados conservando el ambiente (Martínez, 1999). Los fertilizantes químicos han sido benéficos para el sector agrícola en general, sin embargo, el abuso en la utilización de ellos genera residuos químicos de las sales que contienen produciendo la salinización, problemas en el drenaje, compactación del suelo y disminución de la actividad microbiana comprometida en el proceso de nutrición vegetal. Se ha comprobado que cada año se incrementa la cantidad de fertilizantes por aplicar, debido a la menor eficiencia de adsorción en el suelo y absorción en la planta aumentando los costos en la producción. A lo anteriormente dicho se suma el problema ambiental, debido a la producción de los gases tóxicos que se desprenden de los fertilizantes, como los óxidos de nitrógeno que dañan la capa de ozono (Kiehl, 1995; Orozco, 1995; Corporación Bioma, 1995; Coronado, 2002; Meunchang et ál, 2005; Curso Internacional, 2006).

La actividad y eficiencia de los microorganismos de vida libre con capacidad de fijar nitrógeno han demostrado un extraordinario potencial para la explotación agrícola. Los resultados de investigaciones sobre la incorporación a los suelos de esta clase de microorganismos (inoculantes microbianos o biofertilizantes) han originado altos rendimientos en las cosechas de una gran diversidad de cultivos, como arroz, maíz, frijol, tomate, etc., minimizando el uso de fertilizantes químicos especialmente los nitrogenados (Meunchang et ál, 2005; Curso Internacional, 2006; Hernández, 1998; Bonilla, 2001).

En los suelos de San Carlos (zona agrícola, Sinú medio del departamento de Córdoba, Colombia) la utilización de fertilizantes químicos, especialmente los nitrogenados (a base de urea), se hace muy necesaria si se quiere aumentar la producción de los cultivos propios de la región: maíz, algodón, plátano, sorgo, pastos y arroz; sin embargo, los daños ecológicos y los altos costos de estos productos han propiciado el interés hacia la búsqueda de alternativas sustentables que disminuyan el empleo de agroquímicos contribuyendo a la protección ambiental; el conocimiento de poblaciones microbianas nativas, eficientes fijadoras asimbióticas de nitrógeno, permite el aprovechamiento de un recurso propio de la región como inoculante (biofertilizantes) para mejorar la productividad agrícola en el Valle del Sinú. El objetivo de esta investigación fue aislar microorganismos de los géneros *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*, de la rizosfera de zonas cultivadas y de rastrojo (zonas sin cultivar) en el municipio de San Carlos (departamento de Córdoba, Colombia), y evaluar la producción del ión amonio en aislados eficientes en la fijación asimbiótica de nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo: la toma de las muestras se realizó en el Valle del Sinú medio en el municipio de San Carlos, Córdoba (Colombia), enmarcado geográficamente a 8° 48' 2" de latitud norte y a 75° 42' de longitud oeste con relación al meridiano de Greenwich; la precipitación promedio anual no sobrepasa los 1500 mm;

la temperatura promedio es de 27 °C, y la humedad relativa promedio es de 82%. La zona se clasifica como bosque húmedo tropical (Santana, 1999; Montoya, 2000).

En cada lote de cultivo (plátano, pastos, maíz) y rastrojo se efectuó un recorrido en zig-zag abarcando la máxima extensión tomándose cantidades de suelo de los primeros 15 cm de la superficie de la rizosfera, retirando previamente la capa superficial (hojarasca y materia orgánica semidescompuesta). Al finalizar el recorrido en cada cultivo se hizo una mezcla de las muestras recogidas y se realizó un cuarteo para obtener 1000 g de suelo representativo de cada cultivo y de rastrojo.

Aislamiento e identificación de los microorganismos de los géneros: *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*. Se realizaron diluciones seriadas de 1:10 y las dos últimas fueron sembradas en caja de Petri con medios apropiados e incubadas a una temperatura de 28 °C durante 3 días; después de este tiempo se revisaron las cajas de Petri y se observaron las colonias típicas. Se emplearon diferentes medios de cultivo selectivos por géneros: a) Burk's, Asbhy y Jensen's, (género *Azotobacter sp*), y b) Burk's, NFB y rojo congo (género *Azospirillum sp*) (Dobereiner et ál, 1995; Buchanan, 1994; Aguilar et ál, 1995; Bernal et ál, 2000; Park et ál, 2005; Tejera, 2005; Curso internacional, 2006). También se realizaron siembras de muestras directas, (Aquilanti et ál, 2004). Se realizaron ensayos por triplicado.

Los caracteres fisiológicos y bioquímicos de los aislados bacterianos fueron examinados de acuerdo con los métodos descritos en el manual de Bergey's (Holt, 1994; Buchanan et ál, 1994) y consistieron en: color de pigmentos utilizando los medios específicos; morfología de la colonia observada por la forma, elevación, margen, superficie y opacidad; prueba de Gram, realizada a través de métodos estándares; producción de ácidos, indicado por el cambio de color en el medio; pruebas de asimilación utilizando diferentes fuentes de carbono. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Cuantificación de la producción del ión amonio a partir de los aislados microbianos: para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de las poblaciones aisladas, *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*, se utilizó el método indirecto de valoración del ión amonio empleando la técnica calorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito) (Weatherburn, 1967; Martínez, 2003); el procedimiento realizado consistió en inocular los aislados en un medio de suelo al 10%, y luego incubados a una temperatura de 28-29 °C durante un tiempo de 72 horas con agitación constante a 150 rpm. Pasado este tiempo, se añadieron 25 ml de KCl 2M, manteniéndose el proceso de agitación por una hora más; seguidamente se dejó en reposo hasta que todo el suelo se depositó en el fondo; se tomaron 10 ml del sobrenadante, se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos, se le adicionaron 0,4 ml de solución alcohólica de fenol al 10%, 0,4 ml de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1 ml de solución oxidante, la cual se preparó mezclando 20 g citrato de sodio, 1 g de hidróxido de sodio y 1 ml de hipoclorito de sodio 1,5 N en 100 ml de H₂O. La mezcla se mantuvo en reposo durante 1 hora y posteriormente se midió la absorbancia a 632,9 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 11 UV-Vis.

Como blancos de suelo se utilizaron muestras de tierras esterilizadas (sin microorganismos) de los diferentes cultivos, a las cuales se les determinó la concentración del ión amonio por el método descrito anteriormente. Las concentraciones de amonio obtenidas del sistema (suelo inoculado) fueron corregidas teniendo en cuenta los blancos de suelo, para obtener el valor real de la producción de amonio por las bacterias.

La curva patrón se trazó a partir de una solución estándar de 80 ppm de NH₄Cl, y el rango de trabajo fue de 0,8-5,6 ppm. Ensayos por triplicado.

Para la estandarización del método se estimaron las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión, los coeficientes de determinación (r²), límite de detección y cuantificación, normalidad de residuales y test de proporcionalidad, utilizando el software Analyse-it for Microsoft Excel®. Con los da-

tos obtenidos de las muestras se realizó la t de Student para comparar los valores entre medias de cada una en los distintos días de análisis (2 días). La t de Student se calculó como se indica en las ecuaciones que se muestran a continuación, y se tomó a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ y 4 grados de libertad (Miller y Miller, 1993; AEFI, 2001).

$$t = (X_1 - X_2) / S (1/n_1 + 1/n_2)^{1/2}$$

donde t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

$$S^2 = [(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

El tratamiento de las muestras se realizó por duplicado, y cada muestra se evaluó por triplicado. Se compararon las señales promedio de cada muestra para los diferentes días mediante pruebas de significancia. Se realizó un ensayo adicional de la determinación del ión amonio a los 3 mejores aislados, que consistió en la inoculación de los microorganismos en 25 ml de medio Burk's líquido (libre de fuente de nitrógeno) (Park et ál, 2005), durante 72 horas en agitación constante a 150 rpm; pasado este tiempo se tomaron 10 ml de sobrenadante y se centrifugaron a 2000 rpm por 20 minutos; a este sobrenadante se le aplicó el tratamiento antes mencionado (Berthelot), y la absorbancia se midió a 633,8 nm.

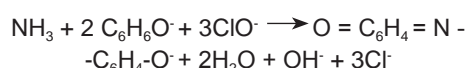
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Bacterias aisladas de la rizosfera de San Carlos: se aislaron diversas poblaciones microbianas a partir del suelo de la rizosfera de cultivos de plátano, pastos, maíz y de rastrojos (zonas sin cultivar) del Valle del Sinu medio en el municipio de San Carlos, Córdoba (Colombia). Los microorganismos fueron transferidos sucesivamente a medios de cultivo sólidos para lograr su aislamiento y purificación; los géneros *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* fueron identificados utilizando medios selectivos libres de nitrógeno, respuestas a pruebas bioquímicas y observaciones microscópicas para confirmar sus características, los cuales morfológicamente

correspondieron a bacilos Gram negativos de tamaño variado (Holt et ál,1994; Buchanan et ál, 1994). De un total de 55 microorganismos aislados, 21 correspondieron al género *Azotobacter* y 15 al género *Azospirillum*; la existencia y distribución ecológica de estas bacterias en un suelo específico está condicionada a diversos factores los cuales determinan su presencia o ausencia; ha sido demostrado que las características físicas y químicas incluyendo contenido de materia orgánica, humedad, relación carbono nitrógeno y pH, las condiciones climáticas y exudados de las raíces de las plantas que sirven de nutrientes para estas poblaciones, afectan la distribución de estos microorganismos (Vessey, 2003).

Determinación del ión amonio: la cuantificación del ión amonio llevada a cabo por el método de Berthelot (fenol-hipoclorito) se basa en la formación de un compuesto azul intenso de indofenol, el cual se observó tanto en los patrones como en las muestras analizadas, y que resulta de la reacción de ión amonio (NH_4^+) con compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante el cual pue-

de ser hipoclorito de sodio (Scheiner, 1976; Van Staden y Taljaard, 1997), u o-fenilfenol (Kanda, 1995); también se utilizan catalizadores, principalmente nitroprusiato de sodio (Kanda, 1995; Standard Methods, 1998) o ferrocianato de potasio (Verdouw et ál, 1977); a pesar de que el mecanismo de reacción no se conoce en detalle se ha observado que depende de la luz, la temperatura, catalizadores, pH; generalmente la reacción puede ser representada como se muestra a continuación, cuando se utiliza fenol e hipoclorito de sodio (Scheiner, 1976; Verdouw et ál, 1977).



En la estandarización del método se encontró que todas las curvas de calibración instrumental realizadas demostraron ser equivalentes a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, por tanto, se escogió la ecuación de regresión que presentó la mejor pendiente y distribución de los residuales normales para cuantificar la producción de amonio y que correspondió a: $y = 0,177x + 0,0041$.

Tabla 1. Producción de amonio por aislados del género *Azotobacter sp* (Región San Carlos, Córdoba)

Aislados del género <i>Azotobacter sp</i>	Concentración promedio de amonio, NH_4^+ (mg/l)	Desviación estándar (s)	CV (%)
A15M2G (rastrojo)	4,4595	0,1130	2,5339
A16PG (plátano)	5,1545	0,0433	0,8410
A20h*G (Rastrojo)	0,9077	0,0414	4,5610
A21Mb2 (maíz)	2,2387	0,0800	3,5600
A23PP (plátano)	4,1001	0,5858	14,2886
A25M2f (rastrojo)	4,1873	0,4849	11,5802
A26M1P (rastrojo)	5,1743	0,0403	0,7800
A27M2C (Rastrojo)	1,8257	0,3738	20,4770

CV = coeficiente de variación

Tabla 2. Producción de amonio por aislados del género *Azospirillum sp* (Región San Carlos, Córdoba)

Aislados <i>Azospirillum sp</i>	Concentración promedio de amonio NH ₄ ⁺ (mg/l)	Desviación estándar (s)	CV (%)
A110F2 (Forraje)	3,1423	0,4595	14,62
A3F2LT (Forraje)	3,2817	0,1356	4,1320
A4ML (Rastrojo)	4,0856	0,0876	2,1441
A5M1G (Rastrojo)	4,6741	0,0919	1,9655
A12P4 (Plátano)	3,8316	0,1610	4,2020
A28F12L (Forraje)	3,2016	0,1120	3,4998

CV = coeficiente de variación.

En las tablas 1 y 2 se resumen los valores promedio (determinaciones por triplicado), de la concentración del ión amonio NH₄⁺ (mg/l) producidos por las diferentes bacterias. Los valores consignados en las tablas corresponden a valores corregidos al restar del sistema (suelo inoculado), los blancos de suelo; por tanto, el valor mostrado se refiere al amonio producido de la actividad microbiana específica.

De los 21 aislados del género *Azotobacter sp*, (Tabla 1) solo ocho mostraron concentraciones de ión amonio (NH₄⁺) cuantificables siendo los mas representativos, A16PG (5.15 mg/l) proveniente de suelos cultivados de plátano y A26M1P (5.17 mg/l) de suelos no cultivados (rastrojos). Se puede observar que el coeficiente de variación del 87,5% de los aislados fue menor que 15%, lo cual denota que la variabilidad de la concentración de ión amonio en cada uno de los ensayos fue poco significativa (AEFI, 2001). De los 15 aislados del género *Azospirillum sp* (tabla 2) solo seis de ellos tuvieron concentraciones de ión amonio cuantificables; de estos el más representativo correspondió a A5M1G (4,67 mg/l) proveniente de muestras de rastrojo. Se puede observar que el coeficiente de variación, en todos los casos, es menor del 15%, valor que es aceptado cuando se lleva a cabo un método microbiológico (AEFI, 2001), por tan-

to, la variabilidad en la concentración de ión amonio de los aislados con respecto a los diferentes días es aceptable.

Aunque los resultados descritos en las tablas 1 y 2 demuestran la capacidad fijadora de nitrógeno de los aislados nativos, se realizó un ensayo adicional utilizando un medio de cultivo libre de nitrógeno (medio Burk's), es decir, no se dispuso de suelo al 10%; el ensayo se llevó a cabo empleando las bacterias que mostraron las mayores concentraciones en la producción de amonio y que correspondieron a los aislados A26M₁P, A16PG y A₅M₁G. Los datos se consignan en la tabla 3.

Los resultados obtenidos en la tabla 3 confirman la capacidad de las bacterias para convertir el nitrógeno atmosférico en amonio y exudarlo al medio; en el experimento, los microorganismos no disponen de otra fuente de nitrógeno para su crecimiento, sino el presente en el aire contenido dentro del recipiente debido a que el medio de cultivo utilizado carece de este elemento.

La fijación biológica del nitrógeno es llevada a cabo por los microorganismos, gracias a la nitrogenasa, sistema enzimático que cataliza la reducción de nitrógeno a amoníaco, con liberación de hidrógeno. El complejo enzimático además puede reducir otros sustratos como el acetileno, propiedad que ha permiti-

Tabla 3. Concentración de ión amonio producido por las tres mejores bacterias empleando medio Burk's (libre de nitrógeno).

Aislados bacterianos	Absorbancia	Señal corregida	Promedio señal corregida	Concentración ión amonio mg/l
A26M ₁ P (<i>Azotobacter sp</i>)	0,076 0,074 0,076	0,048 0,051 0,048	0,049	0,2580
A16PG (<i>Azotobacter sp</i>)	0,075 0,076 0,077	0,047 0,048 0,049	0,048	0,2522
A ₅ M ₁ G (<i>Azospirillum sp</i>)	0,066 0,048 0,052	0,038 0,044 0,024	0,035	0,1780

do el desarrollo de una técnica para estimar la actividad nitrogenasa por cromatografía de gases y que se conoce como reducción del acetileno (ARA) (Zuberer, 1998); aunque la mayoría de los trabajos reportan la evaluación de la capacidad fijadora del nitrógeno a través de esta técnica, los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que otros métodos también indirectos resultan ser de gran utilidad para este mismo fin.

La capacidad de fijación de N₂ por las bacterias de vida libre varía considerablemente en dependencia de la composición del medio, del pH del suelo, la temperatura y aireación, de la presencia de nitrógeno combinado, de la naturaleza de las fuentes de carbono, de los microelementos y de la acción de organismos antagónicos en el medio (Zuberer, 1998). Los procesos naturales de fijación biológica del N₂ (FBN) juegan un papel importante en la activación de los sistemas agrícolas sustentables por el beneficio que confieren al agricultor y al ambiente. El incremento en la aplicación de productos ecológicos a base microorganismos fijadores asimbióticos de nitrógeno ha demostrado como efectos positivos la disminución en la utilización parcial y en algunos casos total, de fertilizantes nitrogenados (Vessey, 2003).

La evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno de las poblaciones aisladas, medida indirectamente a través de la cuantificación del ión amonio, permitió encontrar

microorganismos con un potencial de uso en la agricultura de la región de San Carlos. Las asociaciones de bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno con las plantas han sido consideradas como una de las posibles alternativas para la fertilización de nitrógeno inorgánico favoreciendo el desarrollo, crecimiento y la producción (Ladha y Reddy, 2000); en todos los países se han adelantado investigaciones sobre estos microorganismos y su utilización, debido a los excelentes resultados obtenidos.

El aislamiento y la evaluación de microorganismos autóctonos fijadores asimbióticos de nitrógeno de la zona de San Carlos, Valle del Sinú medio en el departamento de Córdoba (Colombia) que favorezcan los rendimientos en los cultivos por sus aportes de nitrógeno, ofrecen una alternativa viable y de gran valor para la agricultura sostenible de la región. Los resultados obtenidos en el presente trabajo darán las bases para el desarrollo a futuro de nuevos biopreparados (biofertilizantes), acorde con las necesidades del sector agrícola de Córdoba que sustituyan o minimicen la utilización de productos químicos.

CONCLUSIÓN

De los 36 microorganismos aislados de la zona agrícola de San Carlos, Córdoba (Colombia) pertenecientes a los géneros *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*, y evaluados en su capacidad fijadoras de nitrógeno, se

encontró que 14 de ellos produjeron el ión amonio en un rango de concentraciones de 0,9 hasta 5,2 mg/l. Los aislados del género *Azotobacter sp* identificados como A16PG (5,15 mg/l de amonio) y A26M1P (5,17 mg/l de amonio), y del género *Azospirillum sp*, A5M1G (4,67 mg/l de amonio) resultaron ser los más eficientes en la fijación del nitrógeno medida indirectamente por el método de Berthelot.

AGRADECIMIENTO

Universidad de Córdoba, por el financiamiento del presente proyecto de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEFI. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 2001. *Validación de Métodos Analíticos*. Madrid: España.
- Aguilar, S.; Tofino J. E.; Sánchez R. 1995. Caracterización de dos cepas de *Azotobacter sp* y evaluación de su efectividad en semillas de tomates. En: *Ascolfiminforma*, 22(2): 30-34.
- Aquilanti, L.; Favilla F.; Clementi F. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples, *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1475-1483.
- Baca, B.; Soto, L.; Pardo, M. 2000. Fijación biológica del nitrógeno. *Rev. Elementos*, núm. 38.
- Bernal, C. J.; Valencia, P. S.; Guineth T. M. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*, Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:171-176.
- Bonilla, R.; Novo, C. 2001. Generación de tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. *Corpoica. Regional tres. Boletín de Investigación*, núm. 5.
- Buchanan, R. E.; Gibbons, N. E. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company.
- Coorporación Bioma. 1995. I Congreso Internacional de Agricultura Biológica y medio Ambiente. Memorias. Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Coronado, M. 2002. Agricultura orgánica vs Agricultura convencional. Disponible en <http://www.ciedperu.org/manuales/organico>. www.ciedperu.org/manuales/organico.htm
- Curso Internacional. 2006. Producción de biofertilizantes desde el laboratorio al campo, Universidad Nacional de Colombia, Colciencias-Cabbio-Biocultivos, Instituto de Biotecnología (IBUN), Bogotá, Junio 19-25. Memorias.
- Dobereiner, J.; Baldani, V. D.; Baldani, J. I. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília-DF: EMBRAPA-SPI. Itaguaí.
- Hernández Y. 1998. La fijación biológica del nitrógeno. *Rev Cubana de Ciencias Agrícola*, núm. 32.
- Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T., Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Kanda J. 1995. Determination of ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPPS). *Water Research*, 29, 2746-2750.
- Kiehl, J. 1995. Fertilizantes orgánicos. Sao Pablo. Ed Ceres, p 492.
- Ladha, J. K., Reddy, P. M. 2000. The quest for nitrogen fixation in rice. Proceedings of the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, 9-12 Aug. 1999, IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines.
- Martínez, E. M. 2003. Fisiología de la asimilación de nitrógeno en *Halosferax mediterranei*. Purificación y caracterización de nitrato y nitrato reductasas asimilativas. Tesis Doctorado. Universidad de Alicante. Facultad de Ciencias. Depto de Agroquímica y Bioquímica. Barcelona, España.
- Martínez, M. 1999. Seminario Microbiología de suelos. Memorias, Cooperativa de Profesionales para el Desarrollo de Tecnología Ambiental LTDA. B/manga. Santander, Colombia.

- Meunchang S. et ál, 2005. Inoculation of sugar mill by-products compost with N₂-fixing bacteria, *Plant and Soil*, 271: 219-225.
- Miller, J. C.; Miller, J. N. 1993. Estadística para química analítica. 2 edición. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana.
- Montoya L. 2000. Diagnóstico preliminar de la microcuena arroyo boca de la Ciénaga San Carlos (Córdoba). Corporación Autónoma Regional de los valles del Sinú y San Jorge.
- Orozco F. 1995. Impacto ambiental de los fertilizantes en la agricultura con énfasis en el cultivo de papa. Problemática ambiental del sector agropecuario en Colombia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Park, M.; Chungwoo, K.; JInchul, Y.; Hyoungseok, L.; Wansik, S.; Seunghwan, K.; Tongmin, S. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160: 127-133
- Santana, J. 1994. *Diccionario cultural de Córdoba. Colombia*.
- Scheiner, D. 1976. Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water Research* 10: 31-36.
- Stantard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1998. Nitrogen, 20 Th Ed., American Public Health Association, Washington.
- Tejera, N. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil* 270: 233-232.
- Van Standen, J. F., Taljaard R. E. 1997. Determination of ammonia in water and industrial effluent streams with the indophenol blue method using sequential injection analysis. *Analytical Chemical Acta*, 344: 281-289.
- Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., Dekkers E. M. J. 1977. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12: 399-402.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol hypochlorite reaction determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971.
- Zuberer, D. 1998. Biological Dinitrogen Fixation: Introduction and Nonsymbiotic. En principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Prentice Hall.