

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMIA

**Efecto de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Frank)  
y *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) inoculadas a la  
rizósfera de *Trifolium pratense* L.**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Ciencias Agrarias

**Magdalena Westermeyer Izquierdo**

VALDIVIA-CHILE

2006

**PROFESOR PATROCINANTE**

**FIRMA**

Luigi Ciampi P.  
Ing. Ag. , M.Sc., Ph. D.

---

**PROFESORES INFORMANTES**

Ricardo Fuentes P.  
Ing. Ag. M.Sc.

---

Oscar Balocchi L.  
Ing. Ag. M.Sc.,Ph. D

---

**INSTITUTO DE PRODUCCIÓN Y SANIDAD VEGETAL**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios. A mi padre, porque siempre me ha escuchado y dado el consejo adecuado y por ser clave en el descubrimiento de mi vocación. A mi madre por enseñarme a pelear por lo que se quiere. A Catalina y Felipe por ser tan acogedores, a Antonio por darme tantas alegrías en momentos de desánimo, a Constanza, Roberto y Felipe, por su apoyo y amistad. A la Nena y el Tata y la Oma a quienes adoro. Agradecimientos especiales a mi Opa Ricardo, por influir y tratar de traspasarme algunos de sus conocimientos. A Inés y Rosa, por sus cuidados y cariño.

A mi profesor, Don Luigi, Don Oscar y Don Ricardo, que con paciencia y dedicación me guiaron en este trabajo. Y a todos los profesores de la Facultad que con buena disposición me enseñaron durante estos años. Muchas gracias.

Quiero agradecer especialmente a la Tante Sylvia, porque personas como ella hacen grande nuestra Universidad. Gracias por su disposición.

A todos los que en algún momento me ayudaron a realizar este trabajo, a Don Ramón, Srta Hortensia, Sra. Marta, Don Adolfo Estay, Kuki, Gisela, Ricardo, Mauricio, Eduardo, Chispa, Jorge. Gracias por la ayuda.

A mis amigos, Kuki, Carlos S., Kuky, Cristian S., Carlos K., Peter, Max, Paulina, Cony, Pía, Lolo, Maca, Claudia, Andrés S., Piro, Oscar, Matías, Marga y Matías Jr. y todos los demás que han sido parte fundamental de mi vida y lo seguirán siendo, gracias por su amistad y por hacer de este tiempo, recuerdos increíbles que no voy a olvidar nunca.

“A mis padres”

## INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	El trébol rosado <i>Trifolium pratense</i> L	3
2.2	La Rizósfera	5
2.3	Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	5
2.3.1	Familia Enterobacteriaceae	6
2.4	Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN)	8
2.4.1	Familia Rhizobiaceae	8
2.4.1.2	Simbiosis <i>Rhizobium</i> –Leguminosas	10
2.4.1.3	Nodulación	10
2.5	La bioencapsulación	11
2.6	Fertilización y fijación biológica de nitrógeno	12
3	MATERIAL Y METODO	14
3.1	Material	14
3.1.1	Material Vegetal	14
3.1.2	Cepas bacterianas	14
3.1.3	Invernadero	14
3.1.4	Sustrato	15
3.1.5	Otros	15

Capítulo	Página	
3.2	Método	15
3.2.1	Obtención y aislamiento de las cepas	17
3.2.2	Bioencapsulación de las cepas	18
3.2.2.1	Medio para la encapsulación de las cepas	18
3.2.2.2	Siembra de cepas en el caldo	18
3.2.2.3	Constitución del concentrado celular	19
3.2.2.4	Bioatrapamiento	19
3.2.3	Recuento celular de las biocápsulas (UFC/ml)	20
3.2.4	Esterilización del suelo	20
3.2.5	Llenado de maceteros	21
3.2.6	Enmienda y fertilización del sustrato	21
3.2.7	Inoculación del sustrato con cápsulas	22
3.2.8	Siembra de las plantas de <i>T pratense</i>	23
3.2.9	Riego de las plantas de <i>T pratense</i>	23
3.2.1.0	Corte de las plantas de <i>T pratense</i>	23
3.2.1.1	Diseño experimental	24
3.2.1.2	Evaluación del ensayo	25
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	27
4.1	Efecto de la inoculación de <i>P agglomerans</i> y <i>R trifolii</i> en plantas de trébol rosado sobre la producción de materia seca	27
4.1.1	Producción de MS al primer corte	27
4.1.2	Producción de MS al segundo corte	29
4.1.3	Producción total de materia seca	29
4.1.4	Producción de materia seca radical	31
4.2	Efecto de la inoculación de <i>P agglomerans</i> y <i>R trifolii</i> sobre el nitrógeno presente en plantas de trébol rosado	32

4.2.1	Extracción de nitrógeno al primer corte	33
4.2.2	Extracción de nitrógeno al segundo corte	35
4.2.3	Extracción total de nitrógeno (primer y segundo corte)	37
4.2.4	Extracción de nitrógeno en tejido radical	39
4.3	Efecto de la inoculación de bacterias <i>P agglomerans</i> y <i>R trifolii</i> en plantas de trébol rosado, sobre la nodulación	42
5	CONCLUSIONES	43
6	RESUMEN	44
	SUMMARY	45
7	BIBLIOGRAFIA	46
	ANEXOS	52

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Análisis químico del suelo usado como sustrato antes y después del proceso de esterilización	21
2	Diseño experimental utilizado en la presente investigación	25
3	Escala de notas para medir nodulación de plantas de <i>T pratense</i>	26
4	Tabla de frecuencia de nodulación en plantas de <i>T pratense</i> cultivar Quiñequeli	41

**INDICE DE FIGURAS**

Figura		Página
1	Diagrama de etapas del ensayo	16
2	Producción de MS al primer corte para los distintos tratamientos	28
3	Producción de MS al segundo corte para distintos tratamientos	29
4	Producción de MS total aérea	30
5	Producción de MS en la raíz al segundo corte para los distintos tratamientos	32
6	Extracción de nitrógeno aéreo en el primer corte en plantas de trébol sometida a distintas inoculaciones y fertilización	34
7	Extracción nitrógeno aéreo en el segundo corte en plantas de trébol sometida a distintas inoculaciones y fertilización	36
8	Extracción nitrógeno aéreo total en plantas de trébol rosado sometidas a distintas inoculaciones y fertilización	38
9	Extracción nitrógeno radicular en el segundo corte en plantas de trébol rosado sometidas a distintas inoculaciones y fertilización	40
10	Nodulación según escala para los distintos tratamientos al segundo corte	41

**INDICE DE ANEXOS**

Anexo		Página
1	Agar papa dextrosa	53
2	Caldo papa dextrosa	53
3	Pruebas de Identificación C2 <i>Pantoea agglomerans</i>	54
4	Agar/Caldo rojo Congo manitol	56
5	Alginato	56
6	Recuento de UFC	57
7	Cálculos de fertilización	58

## 1 INTRODUCCIÓN

En Chile y en particular la región sur austral, las praderas constituyen el principal recurso alimenticio para el ganado. Éstas, además, protegen al suelo de los agentes erosivos del medio ambiente y mejoran su fertilidad elevando el tenor de materia orgánica.

En este contexto, el trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), es un importante recurso forrajero en el mundo y particularmente en Chile. Esta especie es ampliamente utilizada, ya sea sola o en asociación con gramíneas, tanto para producción de semillas como para forraje.

Una adecuada fertilización constituye un factor fundamental para una buena producción agrícola, ya que ésta se relaciona directamente con el rendimiento vegetal. Asimismo, constituye una parte importante de la inversión al momento de establecer una pradera y mantenerla.

En la actualidad, es conocido que para la producción de fertilizantes es necesaria una gran cantidad de energía, generalmente obtenida del petróleo, un recurso no renovable. Simultáneamente, el uso irracional y desmedido de fertilizantes químicos, ha provocado contaminación en cursos de agua cercanos, llevando a la eutroficación de ecosistemas fluviales y lacustres.

Es debido a estas razones que una buena alternativa a la fertilización nitrogenada la constituye la fijación biológica de nitrógeno. Proceso llevado a cabo por algunos microorganismos de la rizósfera.

En el presente trabajo de tesis se ha planteado la siguiente hipótesis: “Cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* F. y *Pantoea agglomerans* B., al ser inoculadas a la rizósfera, promueven el crecimiento en trébol rosado cv. “Quiñequeli”.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto de *P. agglomerans* y *R. trifolii* bv. *leguminosarum*, inoculadas a la rizósfera de plantas de *Trifolium pratense*.

Los objetivos específicos son:

Evaluar el comportamiento de dos cepas bacterianas seleccionadas atrapadas en matrices gelificadas de alginato bajo condiciones controladas.

Establecer el efecto de las cepas bioatrapadas sobre el crecimiento de la planta, mediante el análisis de nitrógeno y materia seca de las plantas de trébol rosado.

Determinar, por medio de los parámetros anteriores, si el efecto producido por las cepas, es sinérgico o se interfieren.

Analizar la relación existente entre la fertilización y la acción de las cepas inoculadas a la rizósfera de *T. pratense*.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 El trébol rosado *Trifolium pratense* L.

El trébol rosado es una especie originaria de Europa, que actualmente se encuentra ampliamente distribuida en todos los continentes. En Chile se utiliza desde Santiago hasta Chiloé (TORRES, 1991). Es posible encontrarla colonizando desde los 30° hasta los 43° de latitud sur (CHILE, CORPORACIÓN DE FOMENTO. CORFO, 1982).

Corresponde a una planta de tipo decumbente, es decir, durante la primera etapa ésta tiene un crecimiento erecto, luego llega un momento en el cual los tallos no pueden seguir soportando el peso del follaje y la planta se tiende y continúa su desarrollo sobre el suelo. Cuando esto ocurre es más difícil utilizarla y aumentan las pérdidas (CUEVAS y BALOCCHI, 1983).

Su raíz es pivotante y profundizadora, alcanzando hasta un metro, con numerosas raíces secundarias, lo que la hace resistente a la sequía. Tiene una corona ancha, desde la cual se desarrollan los tallos que pueden alcanzar hasta 60 cm. Las plantas poseen hojas trifoliadas y pilosas de gran tamaño. Su inflorescencia es de color rosado a violeta, dispuesto en forma de cabezuela, conteniendo cada una de estas alrededor de 110 flores (TORRES, 1991).

Es una especie tolerante a las heladas, su máxima sensibilidad a bajas temperaturas corresponde al estado de plántula. Su temperatura mínima tolerable es de -1°C. Mientras que la temperatura óptima para su desarrollo corresponde a los 20°C, aunque es capaz de tolerar rangos entre los 5°C a los 35°C (CORFO, 1982).

Se caracteriza por ser una especie de alto valor forrajero, de buena productividad y excelente valor nutritivo. En cultivos bajo riego en el dominio seco estival su potencial de producción puede llegar hasta las 18 t MS/ ha/ año (CUEVAS y BALOCCHI, 1983).

Esta especie, se adapta a variados tipos de suelo, aunque su máxima producción se alcanza en aquellos que poseen textura media a pesada, en suelos medios a profundos, fértiles, bien drenados con buena capacidad de retención de humedad, planos o casi planos, con menos de un 5% de piedras y menos de 10% de gravas. Prefiere un rango de pH entre los 5,5-6,5 (CORFO, 1982).

Debido a que posee un crecimiento erecto, se adapta perfectamente a condiciones de corte, de la misma manera, se le puede utilizar para pastoreo, permitiéndosele un rezago adecuado que le permita acumular reservas para el rebrote (CUEVAS y BALOCCHI, 1983).

Las principales variedades que se comercializan en Chile, corresponden a: "Quiñequeli", "Pawera" y "Hamua", estas dos últimas, han sido introducidas a Chile desde Nueva Zelanda (TEUBER, 1980).

Es una especie de fácil establecimiento, que se puede sembrar asociada a cereales. Cuando es utilizada en siembras de regeneración de praderas se obtienen buenos resultados, en mezclas con ballica italiana e híbrida. Frecuentemente se utiliza para praderas de rotación y en praderas permanentes para incrementar la producción de forraje durante los primeros años (TORRES, 1991).

## **2.2 La Rizósfera.**

La definición del término rizósfera varía según los autores. Muchos difieren en aspectos específicos. En la mayoría de los casos, se considera como tal, la porción de desarrollo de suelo que esta bajo la influencia inmediata del sistema radicular de la planta (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

La rizósfera esta constituida por la zona del suelo que envuelve a las raíces y que se encuentra influenciada por el sistema radicular de la planta. Este sector se caracteriza por poseer una fuerte concentración de nutrientes y un activo intercambio de compuestos con las plantas (ROVIRA, 1973).

Las altas concentraciones de diversos nutrientes en esta zona responden a la acumulación de sustancias orgánicas, (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987) Estos compuestos orgánicos son liberados a través de procesos de exudación y secreción llevados a cabo por las plantas (CROZIER *et al.*, 1988).

## **2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).**

El crecimiento microbiano es intenso en la rizósfera, el número de bacterias posibles de encontrar en este ambiente es más elevado que en cualquier otra parte del suelo. Las bacterias que se desarrollan allí y que utilizan los compuestos orgánicos liberados a la rizósfera por las plantas como fuente de energía se denominan “rizobacterias” (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista del crecimiento y desarrollo vegetal es posible establecer tres tipos de relación entre las bacterias de la rizósfera y la planta: benéfica, neutral o perjudicial. Cuando es benéfica y posee un impacto positivo tanto en el crecimiento como en el desarrollo de la especie vegetal, se habla de “bacterias promotoras de crecimiento vegetal” o PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) (GLICK *et al.*, 1999). Por otra parte no todos los autores señalan

a la totalidad de las bacterias que tienen algún tipo de relación benéfica con las plantas como PGPR. JIMÉNEZ *et al.* 2001, sostienen que entre ellas se pueden distinguir tres grandes grupos: a) PGPR, b) microorganismos fijadores de nitrógeno c) hongos micorrízicos.

Estos mismos autores señalan que existen cuatro características que definen a las PGPR, distinguiéndolas de otras bacterias benéficas para los vegetales. En primer lugar, no requieren de la invasión interna de tejidos vegetales, como ocurre con las micorrizas y nódulos. Segundo, generan una elevada población en la rizósfera después de ocurrida su inoculación. Tercero, presentan una capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz para influir en el crecimiento de la planta. Cuarto, son inocuas para el hombre.

Al mismo tiempo las PGPR pueden actuar de manera directa o indirecta. Se trata de mecanismos directos de acción aquellos tales como la liberación a la rizósfera de metabolitos producidos y que son utilizados por la planta como reguladores de crecimiento o precursores de estos por las plantas. Son mecanismos indirectos de acción: producción de metabolitos que pueden funcionar como antagónicos, supresión o inhibición de microorganismos perjudiciales, producción de sideróforos, antibióticos, enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia.

**2.3.1 Familia Enterobacteriaceae.** Comprende varios géneros, en ella se encuentran especies que se hallan colonizando la rizósfera de diferentes plantas. Algunos de estos corresponden a: *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Erwinia* y *Citrobacter* (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Dentro de las denominadas enterobacterias, son consideradas PGPR, los géneros *Pantoea* (MERBACH *et al.*, 1998), *Enterobacter*, *Serratia* y *Klebsiella* (PRASAD *et al.*, 2001).

La gran mayoría de las PGPR posee plasmidios, gracias a los cuales ocurre la fijación biológica de nitrógeno. En estas moléculas de ADN extracromosómico se encuentran alojados los llamados genes "NIF", encargados de la fijación biológica de nitrógeno. La expresión de estos, así como su transmisión, podría ser la causa por la cual dentro de esta familia, existen varias especies fijadoras de nitrógeno (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

El ser organismos fijadores de nitrógeno, diferencia a algunas especies de las enterobacterias por sobre otras especies entéricas. Esta propiedad característica, se da estrictamente en condiciones anaeróbicas (STANIER *et al.*, 1996). El oxígeno inactiva de manera irreversible a la nitrogenasa, que corresponde a la enzima responsable de la fijación. Es debido a esta razón que, los organismos fijadores de nitrógeno realizan sus procesos en condiciones anaeróbicas naturales, o en su defecto, pueden crear medios internos anaeróbicos adecuados para llevar a cabo este proceso (TAIZ y ZEIGER, 2002).

*Pantoea agglomerans* es una especie de enterobacteria, bastante cercana a *Erwinia herbicola* (BEIJI *et al.*, 1988). La relación entre estos dos géneros, fue establecida por medio de hibridación DNA/DNA y por propiedades fenotípicas (GAVINI *et al.*, 1989).

En el año 1888, Martinus Willem Beijerinck, botánico y fitopatólogo holandés, la describió con el nombre de "*Bacillus agglomerans*" (Beijerinck 1888). Más tarde, en el año 1972, W. H. Ewing y M. A. Fife modificaron la nomenclatura a *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing y Fife 1972, reconociendo a Beijerinck como el autor original. La lista aprobada de nomenclatura bacteriana omitió a Beijerinck y describió a Ewing y Fife como los autores. En el año 1989, Gavini *et al.* proponen la nueva nomenclatura *Pantoea*

*agglomerans* (Ewing y Fife 1972) Gavini *et al.* 1989. Finalmente en 2004, Edwards *et al.* abogan para que se reconozca a Beijerinck como el autor original de esta especie, reinstalando su nombre y quedando como *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini *et al.* 1989.

Durante la década de los 90 se aisló en Beijing, China, la cepa YS19, desde arroz, *Oryza sativa* cv “Yuefu”, correspondiente a *P. agglomerans*. Al compararla con otras bacterias endófitas aisladas de la misma planta se concluyó que tenía una gran actividad fijadora de nitrógeno (VERMA *et al.*, 2001).

Esta bacteria es capaz de colonizar, tanto la rizósfera de plantas como los tejidos de estas mismas, consiguientemente, se la clasifica como diazótrofa endófito facultativa (BALDANI *et al.*, 1997). Es importante destacar que si bien es capaz introducirse a la planta, no penetra a la célula ni la modifica causando alteraciones en sus tejidos como es el caso de hongos micorrizicos y bacterias que inducen formaciones nodulares.

## **2.4 Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN)**

Se conoce como fijadoras de nitrógeno o diazótrofes a todas aquellas especies de bacterias de vida libre o en simbiosis con plantas, que son capaces de tomar nitrógeno atmosférico y primero reducirlo, para luego fijarlo en la forma de iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (POSTGATE, 1990). El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como “fijación biológica de nitrógeno” (MAYZ-FIGUEROA, 2004).

### **2.4.1 Familia Rhizobiaceae.** Incluidos en esta se encuentran los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN. FAO,

1985). Los *Rhizobium* corresponden a bacterias Gram negativas y aerobias obligadas que pertenecen a la familia Rhizobiaceae.

*Rhizobium trifolii* bv. *leguminosarum* se caracteriza por ser un microorganismo unicelular en forma de bastón que existe sólo en forma vegetativa. Al contrario que otros microorganismos del suelo, no produce endosporas y es móvil, ya que presenta flagelos peritricos o un flagelo lateral. Se multiplica por simple división celular. Su rango de temperatura óptimo para un buen crecimiento y desarrollo es de 28 a 30°C (FAO, 1985).

El género *Rhizobium* se caracteriza por tener la capacidad de penetrar a los pelos radicales de leguminosas de las zonas templadas y algunas tropicales e incitar el desarrollo e hipertrofia celular radical, convirtiéndose en un simbiote intracelular.

Estas bacterias se encuentran alojadas en las raíces de las plantas dentro de estructuras llamadas nódulos. En ellos las bacterias se encuentran presentes en formas pleomórficas o bacteroides, las cuales tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico molecular. ( $N \equiv N$ ) (BUCHANAN y GIBBONS, 1975).

Para nutrirse estos microorganismos pueden utilizar hidratos de carbono, alcoholes y ciertos ácidos como fuentes de energía. El extracto de levadura les proporciona factores de crecimiento y vitaminas (FAO, 1985). Se encuentran comúnmente en los suelos, pero a menudo fallan en producir nodulación efectiva debido a su bajo número en el suelo o por especificidad (FAO, 1985).

**2.4.1.2 Simbiosis *Rhizobium*–Leguminosas.** Las leguminosas se encuentran entre los cultivos más importantes dentro de la agricultura mundial. Suministran alimentos nutritivos para el hombre y los animales. Además de ser ricas en proteínas, lo son también en minerales y vitaminas (FAO, 1985).

Los beneficios recíprocos de esta relación simbiótica se basan en la asociación de bacterias del genero *Rhizobium* con gran parte de las especies de la familia de las leguminosas. El resultado de esta asociación es la formación de un nuevo órgano denominado nódulo. Está localizado en las raíces susceptibles de las plantas y corresponde a la unidad donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (FAO, 1985 y POSTGATE, 1990).

Las ventajas de esta relación simbiótica son múltiples: la planta se puede autoabastecer de nitrógeno, elevando de manera considerable su contenido de proteínas. En caso de cultivos mixtos, puede proporcionar a la especie no leguminosa asociada una cantidad importante del elemento. Asimismo permite dejar en el suelo nitrógeno disponible para la siguiente rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice este elemento. La eficiencia de utilización del nitrógeno fijado es cercana al 100% (URZÚA, 2005).

La simbiosis es inhibida cuando existe un exceso de nitrógeno en el suelo tanto en forma de nitrato o amonio. Cuando las leguminosas se fertilizan con fuentes nitrogenadas, los nódulos se presentan pequeños y poco activos, al disiparse el nitrógeno estos generalmente aumentan de tamaño y funcionan normalmente (FAO, 1985).

**2.4.1.3 Nodulación.** No es posible asegurar el mecanismo de reconocimiento entre el *Rhizobium* y la planta de leguminosa ya que este proceso no se conoce a cabalidad. Sin embargo, se sabe que cuando una célula infectiva de

*Rhizobium* se pone en contacto con la raíz de la planta de leguminosa susceptible, las células de los microorganismos se multiplican y comienzan a colonizar la superficie del pelo radicular. El pelo radicular se encorva, un *Rhizobium* penetra, se multiplica y forma un huso de infección, que se extiende desde la corteza de la raíz e infecta otras células vecinas, luego se incrementa la división celular, formándose de esta manera el nódulo (POSTGATE, 1990)

Los nódulos son muy variados en sus formas, colores, tamaño, ubicación y textura. La forma está determinada por la planta hospedante. El tamaño, distribución y color, está relacionado con la eficiencia del proceso de fijación de nitrógeno (FAO, 1985).

## **2.5 Bioencapsulación.**

En los últimos años, el atrapamiento de células en cápsulas esféricas de alginato de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha convertido en una usada técnica para inmovilizar células vivas. Este método tan versátil, incluye varios tipos de aplicaciones tales como: inmovilización de células tanto vivas como inertes, creación de de protoplastos vegetales para micropropagación o la formación de células hibridadas para la creación de anticuerpos para el atrapamiento de células animales y su posterior implantación en órganos artificiales (SMIDSROD y SKJAK-BRAEK, 1990).

Existen estudios que utilizan como método a la bioencapsulación para la inoculación de semillas con PGPR, mediante el uso de microcápsulas de alginato como sustrato y *Azospirillum brasilense* como bacteria promotora (BASHAN *et al.*, 2002).

El alginato corresponde a un biopolímero natural que proviene de algas y que también es sintetizado por algunas bacterias (SMIDSROD y SKJAK-BRAEK, 1990).

Al inocular directamente cepas de PGPR a un sustrato, excepto en condiciones de previa esterilización, la población bacteriana disminuye considerablemente, ya que esta debe competir con la microflora nativa y predadores. Por esta razón y para darle un ambiente más seguro y nutritivo, de manera inicial a la bacteria, es recomendable el método de bioencapsulación (BASHAN, 1998).

## **2.6 Fertilización y fijación biológica de nitrógeno.**

La fertilización en praderas involucra aspectos del suelo, de las plantas, del clima y su manejo o utilización (BERNIER, 1988). El suelo a través de los procesos de mineralización de la materia orgánica, no es capaz de suministrar todo el nitrógeno requerido por los cultivos. Es debido a esto que el N es normalmente un elemento que se encuentra deficiente en el sistema (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

Un factor importante del rendimiento de las praderas depende del nitrógeno que estas puedan acumular. Cuando se trata de mezclas entre leguminosas y gramíneas, se espera que gran parte del aporte de N esté dado por la asociación efectiva entre *Rhizobium* del suelo y las leguminosas (BERNIER, 1988).

Como consecuencia de la actividad agrícola, se estima que 140 millones de toneladas/año de N son removidas desde la tierra. La fertilización nitrogenada sobrepasa los 25 millones de toneladas/año, de esta cantidad no más de un 50%, es utilizable. El abono y la fijación biológica de nitrógeno aportan sobre 100 millones de toneladas/año. En áreas cultivadas, esta fijación es llevada a cabo por las leguminosas. Dependiendo del contenido de nitrógeno del suelo, estos cultivos pueden utilizar el 80% o más de nitrógeno fijado (BURNS y HARDY, 1975).

La fijación biológica de nitrógeno, constituye un aporte importante ya que disminuye el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, los cuales representan una parte importante de los costos de producción de un cultivo. Además, la producción de éstos, de un alto costo energético, trae consigo problemas ambientales. (MADIGAN *et al.*, 1997).

Los suelos derivados de cenizas volcánicas de la X región de Chile poseen varias características que influyen sobre la fijación biológica de nitrógeno. Un bajo contenido de calcio debido a que el pH es ácido y son altamente fijadores de P. Estos factores limitan la actividad de los microorganismos. En este tipo de suelo existen frecuentemente problemas de deficiencia de azufre, potasio, y en ocasiones de molibdeno, zinc y boro. De igual forma, es posible hallar altos niveles de aluminio y manganeso. Todos estos factores perjudican la fijación biológica de nitrógeno (BERNIER, 1988).

Un estudio realizado por BERNIER *et al.*, 1988 demuestra que las mejores respuestas a la inoculación de *Rhizobium* al suelo se obtienen con cepas nativas que están mejor adaptadas. La aplicación de  $\text{CaCO}_3$  como enmienda calcárea, resulta beneficiosa. La fijación de nitrógeno puede estimularse con una fertilización adecuada con macro y micronutrientes, acondicionamiento del pH del suelo y pelletización e inoculación de semillas.

La contribución del nitrógeno a la nutrición de la planta, depende de; la cantidad de sustratos de C disponibles en la rizósfera, la proporción usada por los microorganismos, la eficiencia fijar  $\text{N}_2$  y la disponibilidad del nitrógeno fijado para la planta (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

### 3 MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 Material

A continuación se exponen los materiales utilizados en el presente estudio. Entre ellos cabe mencionar: variedades vegetales, cepas de microorganismos, sustrato y otros materiales que hicieron posible la realización de este ensayo.

**3.1.1 Material Vegetal.** El material vegetal usado corresponde a plantas provenientes de semilla de *Trifolium pratense*, comercializada por “Agrícola Curiñanco”, cultivar “Quiñequeli”. Estos fueron sembrados en maceteros de bolsa plástica negra de 6 L.

**3.1.2 Cepas bacterianas.** Las cepas de bacteria utilizadas en este ensayo corresponden a una cepa nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y cepa 2 *P.agglomerans*. La primera procedente de la rizósfera de plantas de *T. pratense* y *T. repens*, seleccionadas desde el fundo Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile. La cepa 2 de *P. agglomerans*, fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal (IPSV). Esta cepa fue igualmente extraída desde el fundo Santa Rosa, de la rizósfera de *Lolium perenne*.

**3.1.3 Invernadero.** El ensayo se efectuó en el invernadero del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, ubicado en el campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile. Este invernadero tiene aproximadamente 25 m<sup>2</sup>, es de plástico y madera. Se utilizó desde el 22 de agosto, día en que se realizó la siembra hasta el segundo corte, el 24 de Enero del 2006.

**3.1.4 Sustrato.** El sustrato elegido corresponde a suelo esterilizado. El suelo utilizado para este ensayo es un trumao, traído desde el Fundo Vista Alegre, ubicado en la salida norte de Valdivia, propiedad de la Universidad Austral de Chile. El análisis químico pre y post esterilización del suelo se presentan en el Cuadro 1.

**3.1.5 Otros.** Se utilizó material de laboratorio en general; estufas para incubar el material, agitadores magnéticos, mecheros, cámaras de flujo, autoclaves, agitador orbital, centrifuga, entre otros. En el invernadero se utilizó bolsas de plástico negro de 6L como maceteros, balanza para llenado de las bolsas, palas para el llenado, sacos harineros, bomba de espalda para el riego, hornos para el secado de muestras.

## **3.2 Método.**

En esta sección se describen las metodologías usadas en las distintas etapas en las cuales se llevó a cabo el ensayo.

El estudio fue realizado en dos etapas, una previa en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal (IPSV) de la Universidad Austral de Chile. En esta, se aisló y encapsuló las bacterias a evaluar. Posteriormente se llevo a cabo una segunda etapa en invernadero. En ella se inoculó las bacterias aisladas y encapsuladas en una matriz de alginato al sustrato. Este método se aplicó a las cepas C2 de *P.agglomerans* y a una cepa nativa de *Rhizobium leguminosarum*.

A continuación se presenta la Figura 1 que ilustra las distintas etapas en las que se llevó a cabo el ensayo.

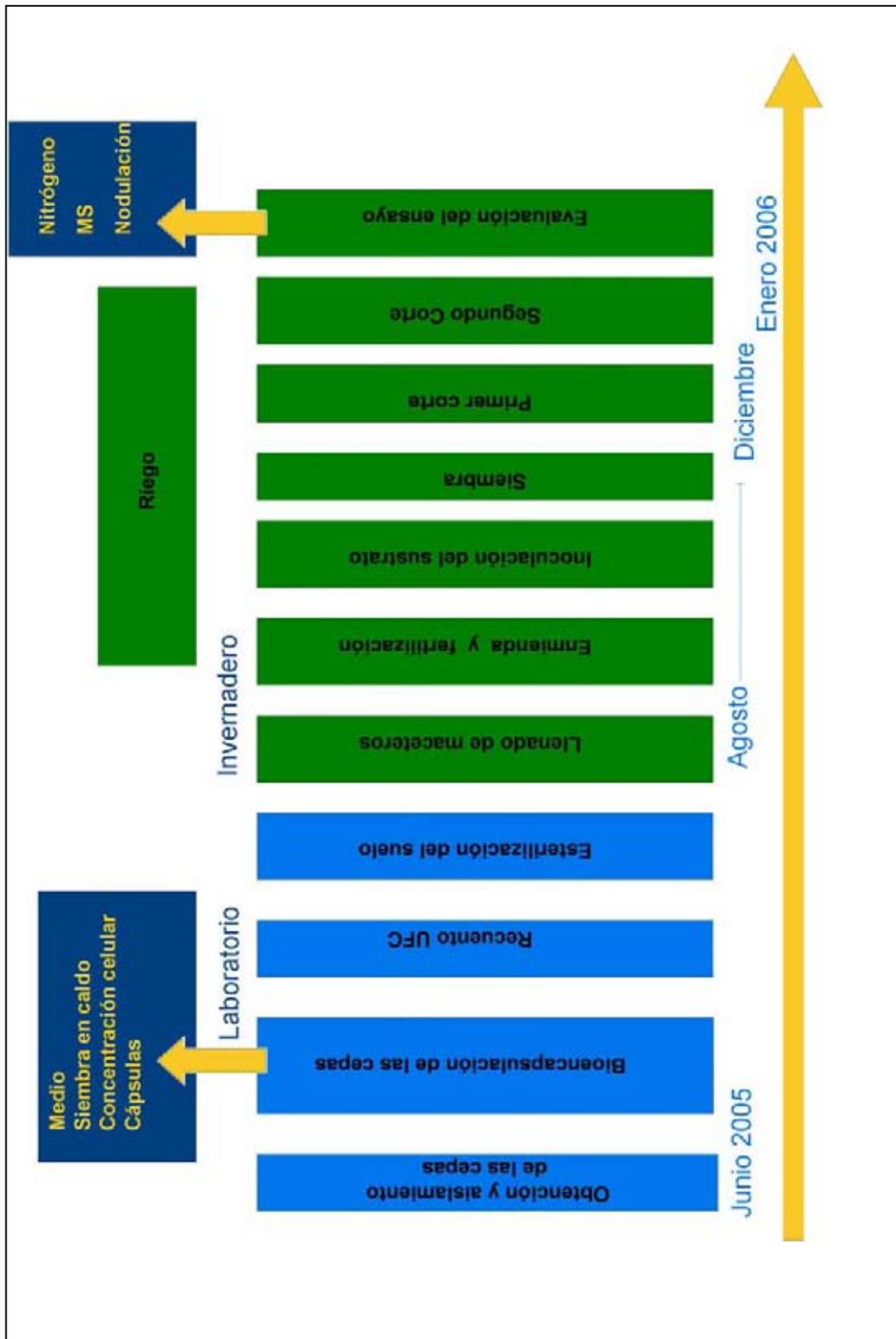


FIGURA 1. Diagrama de etapas del ensayo.

**3.2.1 Obtención y aislamiento de las cepas.** La cepa 2 de *P. agglomerans* se obtuvo del cepario de liofilizado del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal (IPSV). Anteriormente se aisló a partir muestras de rizósfera de *Lolium perenne*, L. creciendo en la Estación Experimental Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile. La extracción se realizó en forma manual considerando 10 cm de profundidad. Posteriormente esta cepa fue identificada en España, mediante secuenciación del ADNr 16s. En esta identificación se utilizó el método de amplificación directa por PCR del ADNr 16s. Finalmente fue liofilizada y agregada al cepario (SCHOEBITZ, 2006). Se reconstituyó agregándole 1 mL de caldo peptona al tubo que contiene a la cepa liofilizada. Posteriormente esta fue introducida a una cámara de cultivo Memmert a 28°C. Luego de 24h, fue sembrada en placas con agar papa dextrosa (ADP) (Anexo 1). En casos de contaminación, se procedió repicando e incubando hasta obtener un cultivo puro en el cual se observan colonias aisladas y perfectamente puras. Para comprobar que se trataba de la cepa deseada y eliminar las dudas a causa de la contaminación, esta fue sometida a pruebas de identificación que se detallan en el Anexo 3.

La cepa nativa de *R. trifolii* se obtuvo a partir de muestras de nódulos de trébol blanco y rosado colectadas en la Estación Experimental Santa Rosa, el día 5 de julio de 2005. Fueron extraídos 30 nódulos, de los cuales se seleccionaron tres que presentaban mayor tamaño y coloración. Los nódulos seleccionados se lavaron con agua y desinfectaron en una solución hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto. Se molieron en una placa de Petri con una baqueta. El inóculo obtenido fue sembrado en placas con agar rojo congo manitol, (ARCM) (Anexo 4) medio indicador de este tipo de bacterias. Las placas sembradas se incubaron en una cámara de cultivo Memmert a 25 ° C, durante una semana, periodo en el cual se obtuvo colonias copiosas y características de esta cepa.

**3.2.2 Bioencapsulación de las cepas.** Una vez obtenidos los cultivos puros de ambas especies de bacterias, se procedió a encapsular las matrices de alginato. Este proceso es necesario para que las bacterias queden atrapadas momentáneamente en el medio, luego de la incorporación de estas al sustrato, puedan dispersarse y comenzar a colonizar la rizósfera. Esta actividad se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del IPSV de la Universidad Austral de Chile y comprendió los siguientes pasos que serán detallados a continuación:

3.2.2.1 Medio para la encapsulación de las cepas. Para la cepa 2 de *P. agglomerans* se usó caldo papa dextrosa (CPD) cuya composición se detalla en el Anexo 2. El medio usado para la cepa nativa de *R. trifolii* fue caldo manitol, esta detallado en el Anexo 3.

3.2.2.2 Siembra de cepas en el caldo. Este método es común para ambas bacterias. Partiendo del cultivo puro de cada bacteria, es necesario sembrar células con una densidad óptica conocida. Para esto se extrae de las placas una cierta cantidad de bacteria, junto al mechero, por medio de un asa de siembra. Esta cantidad desconocida se diluye en 10 mL de agua estéril, en un tubo de ensayo pequeño, hasta lograr una densidad óptica de 1.0, a 600 nm, densidad que equivale a  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Esta dilución se midió en un espectrofotómetro “Sequoia Turner”, diluyendo o concentrando según fue necesario hasta que se obtuvo la densidad óptica deseada.

De esta dilución de densidad óptica conocida se extrae 1mL de suspensión bacteriana y se agrega a un matraz con 500mL de caldo específico para cada cepa. Para *P. agglomerans* se utilizó caldo papa dextrosa, mientras que para *Rhizobium* se utilizó caldo manitol.

Esta preparación se llevó a un agitador orbital o “shaker” (lab.-line instrumenta. Inc.), para obtener un óptimo crecimiento de las bacterias y se

mantuvo a temperatura constante a 27°C y 100 rpm, por 48 h. Luego se colectó por centrifugación.

3.2.2.3 Constitución del concentrado celular. Es necesario centrifugar la suspensión en caldo para separar el sobrenadante del “pellet” o fondo de bacterias que contiene una alta concentración de estas para su posterior bioatrapamiento.

Se utilizó 7 tubos “Falcon” de 50 mL para cada bacteria, con 40 mL de caldo manitol o papa según corresponda. La centrifugación se realizó por 10 minutos a 7000 rpm a 4°C en la centrifuga “Beckman J2-HS” del laboratorio del Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, ICYTAL.

En el laboratorio de Fitopatología, una vez obtenido el “pellet” con bacterias, se unió todos en un mismo tubo Falcon. Con micropipeta se extrajo 2mL de la concentración celular, junto al mechero, adicionándole 10 mL de agua destilada estéril en un tubo de ensayo. De esta dilución se extrajo 2mL y se midió la densidad óptica, la cual debe ser de 1nm. Obtenida esta densidad óptica, se aplicaron 10 mL de esta suspensión a 500 mL de alginato (Anexo 5) agitando por algunos minutos en el agitador magnético.

3.2.2.4 Bioatrapamiento. Para formar las cápsulas, se dejó caer en forma de gotas, el medio de alginato con bacterias, a través de una jeringa de 5 cc, en un vaso precipitado con una solución de ácido glucónico a una concentración de 0,1 M. Este compuesto, actúa como coagulante de la gota, transformándola en una cápsula redonda y firme.

La solución se instaló en un vaso precipitado sobre un agitador magnético para que las gotas formen cápsulas esféricas antes de llegar al fondo del vaso. Luego de 1,5 min se separaron de la solución con un colador

común. Hasta ser usadas en la inoculación del sustrato las capsulas fueron almacenadas en un baso precipitado sellado dentro de un refrigerador.

**3.2.3 Recuento celular de las biocápsulas (UFC/ml).** Con el fin de determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) que existen por capsula, se procedió a introducir 10 cápsulas en bolsas estériles especiales de 10.8 g.

A estas se les agregó 5 mL de agua destilada estéril. La bolsa y el contenido se puso en un sistema de homogeneización modelo Stomacher<sup>f</sup> 80 Laboratory Systems, del laboratorio del Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, ICYTAL. El principio de funcionamiento de este aparato está basado en la combinación de dos fuerzas mecánicas: aplastamiento y agitación de la muestra. Esta se procesó a 260 rpm durante 5 minutos. Los detalles del recuento se presentan en el Anexo 6.

**3.2.4 Esterilización del suelo.** Para aislar el efecto de cualquier otro microorganismo presente previamente en el suelo, éste fue esterilizado en el autoclave del Laboratorio de Fitopatología del IPSV.

Para llevar a cabo este proceso, se utilizó 13 sacos harineros de 50 kilos, los que se llenaron y luego se introdujeron de a dos al autoclave a 1 atm durante 30 min. Previa y posteriormente a la esterilización del suelo se efectuó un análisis de éste en el Laboratorio de Nutrición y Suelos Forestales de la Universidad Austral de Chile, los resultados arrojados se muestran en el Cuadro 1.

**CUADRO 1. Análisis químico del suelo usado como sustrato antes y después del proceso de esterilización (1atm/30 min).**

	<b>Antes</b>	<b>Después</b>
pH en agua (1:2,5)	5,4	5,4
pH CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	4,9	4,9
Materia Orgánica	12,3	12,7
N-Mineral (mg/kg)	193,2	141,4
P Olsen (mg/kg)	10,6	18,4
K intercambiable (mg/kg)	117	106
Sodio Intercambiable (mg/kg)	0,12	0,05
Calcio intercambiable (mg/kg)	3,91	3,5
Magnesio Inter. (cmol/kg)	0, 81	0.71
Suma de bases	5,14	4,53
Aluminio Inter.(cmol+/kg)	0,23	0,23
CICE (cmol+/kg)	5,37	4,76
Saturación de Al (%)	4,3	4,8

FUENTE: LABORATORIO DE NUTRICIÓN Y SUELOS FORESTALES. FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES (2005).

**3.2.5 Llenado de maceteros.** Con el fin de tener un volumen limitado de sustrato que mantenga aislada a la rizósfera y de soporte para el crecimiento de las plantas de trébol se utilizaron 72 maceteros de plástico negro. Una semana previa a la siembra (15 de agosto 2005) se realizó el llenado de estas bolsas macetero con 6 kilos de suelo estéril.

**3.2.6 Enmienda y fertilización del sustrato.** Con el propósito de incrementar el pH del suelo usado como sustrato, se efectuó una enmienda calcárea con una dosis de 2 t/ ha de CaCO<sub>3</sub>. Junto con la enmienda se realizó la fertilización de los maceteros según los tratamientos correspondientes.

Para determinar la dosis de fertilización es necesario conocer el aporte del sustrato por medio del análisis de suelo y el peso seco del suelo utilizado para obtener la densidad aparente. Se utilizó la ecuación  $1\text{ha} \times \text{profundidad (cm)} \times D.\text{ap} = \text{Peso suelo seco}$ , donde D.ap. Corresponde a la densidad aparente del suelo. Reemplazando,  $10.000\text{m}^2 \times 0.2\text{ m} \times 700\text{ kg/m}^3 = 1.400.000\text{ kg}$

Las dosis de fertilización recomendadas para el cultivo son las siguientes: 150 kg de N/ha parcializado (50% siembra, 50% después del 1er corte), 300 kg de  $\text{P}_2\text{O}_5$ /ha, 200 kg de  $\text{K}_2\text{O}$ /ha, 200 kg de Fertiyeso/ha. Según las dosis recomendadas, la fuente mineral y el peso seco se efectuó el cálculo de fertilizante por macetero (Anexo 7). Se obtuvo que para el elemento nitrógeno, se deben utilizar 2,68 g por macetero de nitrato de sodio. Como fuente fosforada se utilizó superfosfato triple en una dosis de 1,86 g por macetero. El elemento K, se proporcionó a la planta como muriato de potasio en una dosis de 0,95 g por macetero y el azufre se aplicó como yeso agrícola 0,857 g por macetero. Además, al realizar la enmienda con cal y magnesio, fueron incorporados con los 5,71 g. por macetero de  $\text{CaCO}_3$ , aproximadamente 4 % de Mg y 2,5 % de S.

**3.2.7 Inoculación del sustrato con cápsulas.** Luego de dos días realizada la fertilización, se inoculó el suelo con las cápsulas de *Pantoea* y *Rhizobium*. Esto se hizo retirando una capa de 5 cm de suelo y agregando 15 cápsulas por macetero según los tratamientos correspondientes, luego se cubrió con los 5 cm de suelo retirado y se aplicó un riego con agua destilada estéril de aproximadamente 100 mL por macetero.

**3.2.8 Siembra de las plantas de *T. pratense*.** Para obtener plantas de trébol rosado se efectuó la siembra el día 22 de agosto 2005. La dosis de semilla fue de 12 kg/ha, que corresponden a 23 semillas por macetero.

Para calcular la dosis de semilla deben considerarse los kg/ha necesarios para obtener una pradera monofítica. Esto depende del tamaño de la semilla, en el caso de trébol rosado es de 600.000 semillas por kg, morfología de la especie, hábito de crecimiento, pureza y poder germinativo (TORRES, 1991).

Luego de la corrección por el porcentaje de germinación obtenido en la prueba de germinación, se determinó que el número de semillas/macetero sería de 50, que corresponden a 10 semillas más/macetero de lo calculado, ya que posteriormente se debe realizar un raleo de plantas dejando 23 plantas por macetero, para asegurar un mismo número de plantas.

Para sembrar, se retiró 1 cm de suelo, se agregó la semilla en forma homogénea y luego se cubrió con el suelo retirado. Posteriormente se regó con bomba de espalda, 7,5L de agua destilada estéril a la totalidad de los maceteros.

**3.2.9 Riego de las plantas de *T. pratense*.** El riego se realizó día por medio, aplicando agua destilada estéril en una cantidad cercana a los 7L con bomba de espalda a la totalidad de las macetas, según las condiciones climáticas. Esta cantidad aumentó a partir del mes de octubre a 15L y a partir de noviembre 30L dependiendo de las condiciones climáticas.

**3.2.10 Corte de las plantas de *T. pratense*.** Se efectuaron dos cortes durante el ensayo. El primero se realizó en prefloración a 4 cm desde el cuello (22 diciembre 2005) y el segundo al 50% de floración (24 enero 2006), separando la parte aérea de la raíz. Este procedimiento se realizó a través de los siguientes pasos:

Para hacer el primer corte se tomó cada macetero y a 4 cm del cuello, se cortó con un tijera todas las plantas. Éstas, fueron pesadas, registrando en una planilla el peso fresco. Luego se juntó la totalidad de la muestra y se introdujo en una bolsa de papel, previamente pesada.

A diferencia del primer corte, al segundo, se tomó cada macetero, sin cortar previamente, se desarmó y se lavaron las raíces. Luego se separó a 4 cm del cuello de la planta con una tijera. Más tarde se procedió de la misma manera que el primer corte, pesando la parte aérea. Se puso la totalidad de la muestra en una bolsa de papel previamente pesada. Las raíces fueron puestas en bolsas aparte. El material vegetal entre el cuello y los 4 cm se incorporó a la bolsa que contiene la parte aérea.

**3.2.11 Diseño experimental.** Se utilizó un diseño factorial de dos factores (fertilización y cepas) con bloques completos al azar, el cual consta de 12 tratamientos y 6 bloques. Con un total de 72 maceteros (Cuadro 2).

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANDEVA). Para realizar estos análisis se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus versión 5.

Cuando las varianzas no resultaron homogéneas, a pesar de transformaciones usadas, fueron tratadas con análisis de varianza simple y la prueba de Kruskal-Wallis, que compara medianas.

La separación de medias se realizó con un test de comparación múltiple, TUKEY ( $P < 0,05$ ). Entre medianas se distinguió por medio de la opción gráfica de cajas y bigotes.

**CUADRO 2. Diseño experimental utilizado en la presente investigación.**

Cepas	Fertilización		
	NPK	PK	S/ Fertilización
<i>Pantoea</i>	6	6	6
<i>Rhizobium</i>	6	6	6
<i>Pant.+Rhiz.</i>	6	6	6
S/Bacteria	6	6	6
<b>Total</b>			<b>72</b>

Tratamientos:

1. *R. trifolii* + *P. agglomerans* sometidos a fertilización completa (NPK).
2. *R. trifolii* + *P. agglomerans* sometidos a fertilización sin N (PK).
3. *R. trifolii* + *P. agglomerans* sin fertilización.
4. *R. trifolii* sometido a fertilización completa (NPK).
5. *R. trifolii* sometido a fertilización sin N (PK).
6. *R. trifolii* sin fertilización.
7. *P. agglomerans* sometido a fertilización completa (NPK).
8. *P. agglomerans* sometido fertilización carente de N (PK).
9. *P. agglomerans* sin fertilización.
10. Sin bacteria sometidos a fertilización completa (NPK).
11. Sin bacteria sometidos a fertilización sin N (PK).
12. Sin bacteria sin fertilización.

**3.2.12 Evaluación del ensayo.** Para evaluar se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

Nitrógeno total extraído en las plantas de *T pratense*. Se realizó un análisis Kjeldhal en el laboratorio de Nutrición y Suelos Forestales, Facultad de

Ciencias Forestales de la Universidad Austral de Chile. Este método, consiste en realizar una calcinación de las muestras a 500 °C durante 7h, posteriormente se realiza una extracción de micro y macro elementos con HCl al 10 %. Finalmente se realiza la extracción Kjeldhal para determinar la extracción de nitrógeno total.

Materia seca. Los cortes separados por tratamientos, repeticiones, parte aérea y raíz según corresponda, se pusieron en bolsas de papel previamente pesadas y se pesaron para obtener el peso de la materia fresca o verde. Luego se llevaron al horno de secado Memmert al laboratorio de Forrajeras del Instituto de Producción Animal. Donde permanecieron por 48 h a 60°C. Transcurrido este periodo de tiempo, se pesaron para obtener el peso en base a materia seca de las muestras.

Nodulación. Se calificó bajo el criterio de la siguiente escala:

**CUADRO 3. Escala de notas para medir nodulación de plantas de *T. pratense*.**

<b>Nota</b>	<b>Descripción</b>
1	Sin nodulación
2	Pocos nódulos, pequeños y blancos.
3	Pocos nódulos, medianos y con color
4	Abundantes módulos, medianos y con color
5	Abundantes nódulos, grandes y con color

FUENTE: CIAMPI 2005

## 4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 4.1 Efecto de la inoculación de *P. agglomerans* y *R. trifolii* en plantas de trébol rosado sobre la producción de materia seca.

En esta sección se describen y discuten los resultados obtenidos en los ensayos referidos a la inoculación de dos cepas y su efecto sobre el extracción de materia seca de las plantas de trébol rosado, para cada uno de los cortes.

Este método es simple y de bajo costo para estimar la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, no toma en cuenta la cantidad de nitrógeno de la planta (concentración que puede variar de 1 a 4 % de nitrógeno en la parte aérea dependiendo de la importancia de la fijación.) Igualmente, este método puede dar una aproximación bastante satisfactoria.

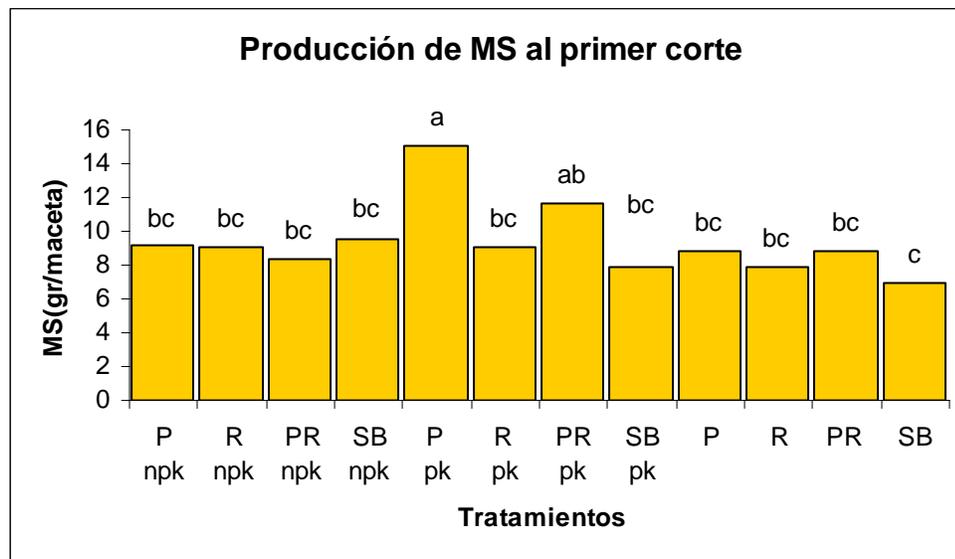
#### 4.1.1 Producción de materia seca al primer corte.

Al medir la producción de materia seca de las muestras, podemos establecer que existen diferencias significativas entre los tratamientos en el primer corte.

Es posible apreciar en la Figura 2 que *P. agglomerans* sin nitrógeno y con fósforo y potasio fue significativamente mayor que la totalidad de los tratamientos, igualándose solo a *P. agglomerans* combinada con *R. leguminosarum* sometida a fertilización sin nitrógeno.

La producción de MS, en las partes aéreas de plantas de trébol para esta etapa del cultivo por parte de los tratamientos con *R. leguminosarum*, fue estadísticamente igual para todos los tratamientos de fertilización. De la misma forma no existen diferencias significativas entre éstos y los testigos. No se

observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos en cuanto MS en la parte aérea de la planta, por la coinoculación de ambas cepas. De la misma forma, no se observan diferencias significativas entre estos tratamientos y los tratamientos testigo.



**FIGURA 2. Producción de MS al primer corte para los distintos tratamientos.**

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%. (TUKEY)

P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria.

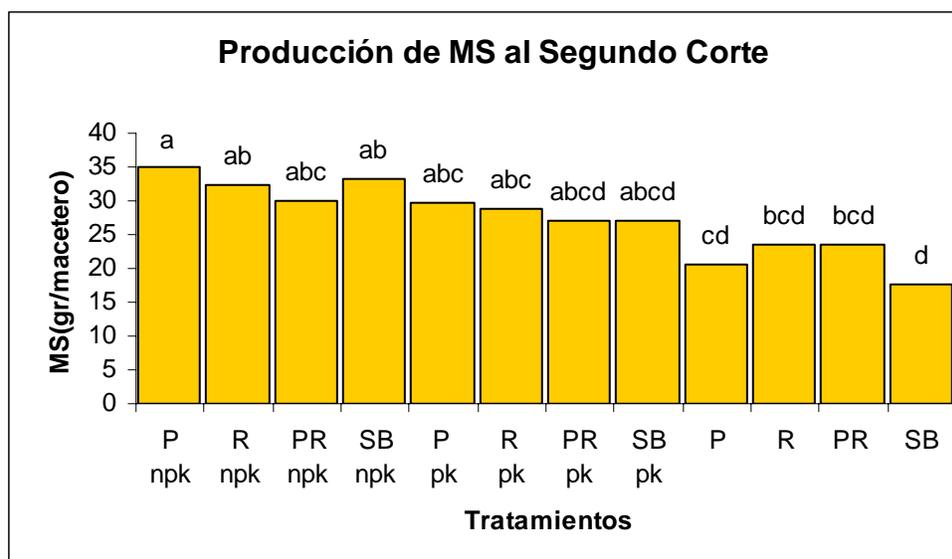
n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio

De lo expuesto anteriormente se desprende que se demuestra un efecto promotor del aumento de MS al primer corte, por parte de *P. agglomerans*, cuando esta se encuentra fertilizada con P y K. Todos los demás tratamientos forman un grupo homogéneo, sin diferencias significativas, entre ellos. Esto coincide con los resultados obtenidos por la extracción de nitrógeno en esta misma etapa del cultivo.

#### 4.1.2 Producción de materia seca al segundo corte.

Al observar la figura 3 y compararla con la figura anterior, se puede afirmar que todos los tratamientos alcanzaron mayores producciones de MS al segundo corte, que al primero. Todos los tratamientos no arrojan diferencias significativas con los testigos.

De lo expuesto anteriormente se puede afirmar que durante esta etapa, la inoculación de microorganismos no tiene mayor influencia sobre la acumulación de materia seca por parte de las plantas de trébol rosado.



**FIGURA 3. Producción de MS al segundo corte para los distintos tratamientos.**

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%. (TUKEY)

P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria.

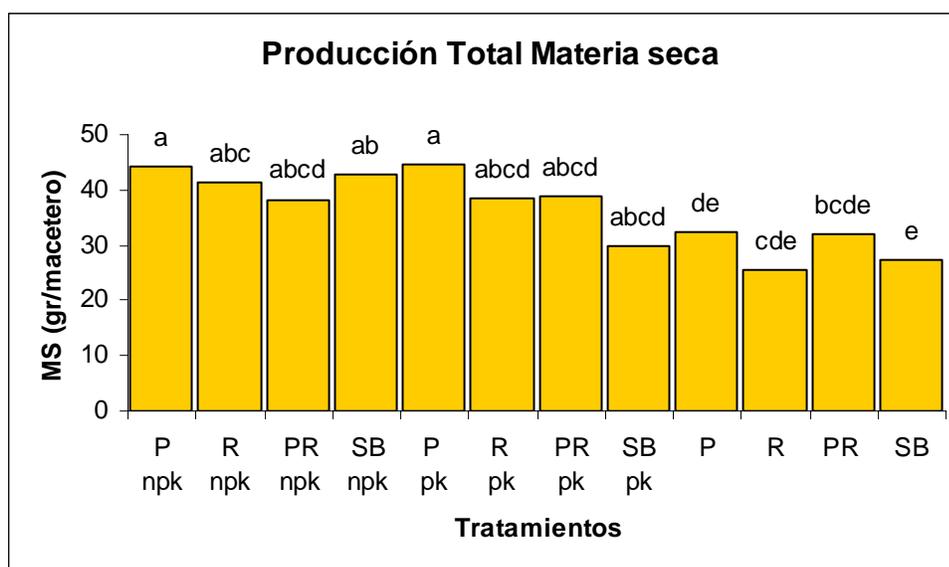
n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio

#### 4.1.3 Producción total de materia seca

En la Figura 4, es posible observar la materia seca acumulada por las plantas de trébol rosado durante todo el periodo que duró el ensayo.

Para el grupo de tratamientos inoculados con *P. agglomerans*, es posible apreciar que aquellos tratamientos con fertilización mineral (P npk y P pk), son estadísticamente superiores que el tratamiento sin fertilización (P). No hay diferencias significativas entre ellos y los testigos. En cuanto a los tratamientos realizados con *R. leguminosarum*, no es posible establecer diferencias significativas entre ellos. De la misma forma, no es posible distinguir diferencias estadísticamente significativas entre éstos y los respectivos testigos.

Cuando los tratamientos corresponden a coinoculaciones de ambas cepas en estudio, se observa que, al igual que ambas cepas por separado, no existen diferencias entre los tratamientos que las contienen ni entre éstos y sus testigos. Cuando las plantas son sometidas a algún tipo de fertilización estas alcanzan los mayores producciones de materia seca, no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos y alcanzando todas niveles sobre los 38 g de MS por macetero.



**FIGURA 4. Producción total de MS aérea.**

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%. (TUKEY)

P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria.

n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio.

De lo presentado en los párrafos anteriores se puede concluir que la inoculación de ambas cepas en estudio no tiene efecto sobre la acumulación de MS en la parte aérea de plantas de *T. pratense* a lo largo del periodo. Sin embargo en el tratamiento de *P. agglomerans* (PK) se observa un efecto importante que iguala a los testigos con fertilización completa (Figura 8). Estos resultados abren perspectivas de una disminución en la administración de nitrógeno en los cultivos en futuros estudios.

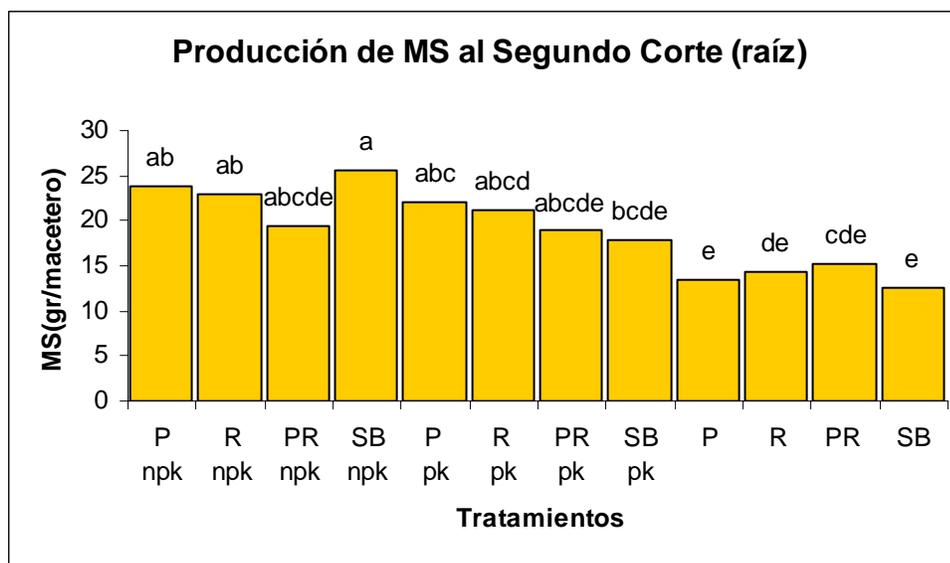
#### **4.1.4 Producción de materia seca radical**

Al analizar el gráfico de la Figura 5 se observan diferencias, para los tratamientos que contienen *P. agglomerans* sin fertilización (P). Éstos son significativamente menores que los resultados obtenidos por la misma bacteria con algún tipo de fertilización mineral (P npk y P pk).

En cuanto a *R. leguminosarum*, la producción de materia seca obtenida por el tratamiento sometido a fertilización completa, es significativamente mayor al que obtiene el tratamiento sin fertilización. No existen diferencias entre estos dos tratamientos y el tratamiento sin nitrógeno. Por lo que el efecto promotor de acumulación de materia seca por parte de esta especie en la raíz de plantas de trébol no quedaría demostrado en esta etapa del cultivo.

Cuando ambas bacterias se encuentran combinadas, no existen diferencias significativas entre las distintas fertilizaciones. En consecuencia no existe un claro efecto de las bacterias estudiadas, en el rendimiento de materia seca radical para esta etapa del cultivo.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la parte aérea, podemos ver que la MS radical es siempre menor que la aérea.



**FIGURA 5. Producción de MS en la raíz al segundo corte para los distintos tratamientos.**

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%. (TUKEY)

P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria.  
n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio.

Quando existe fertilización mineral, las plantas alcanzan mayores producciones de materia seca. Por lo tanto no habría influencia microbiana en la acumulación de materia seca en las raíces por parte de las plantas de trébol rosado ya que la acumulación de materia seca se explica en este caso por el aporte de fertilizante.

#### **4.2 Efecto de la inoculación de *P. agglomerans* y *R. trifolii* sobre el nitrógeno presente en plantas de trébol rosado.**

En este capítulo se describen y discuten los resultados obtenidos en los ensayos referidos a la inoculación de bacterias y su efecto sobre el extracción de nitrógeno de las plantas de trébol rosado cultivar Quiñequeli, para cada uno de los cortes realizados y para ambos sumados.

#### 4.2.1 Extracción de nitrógeno al primer corte.

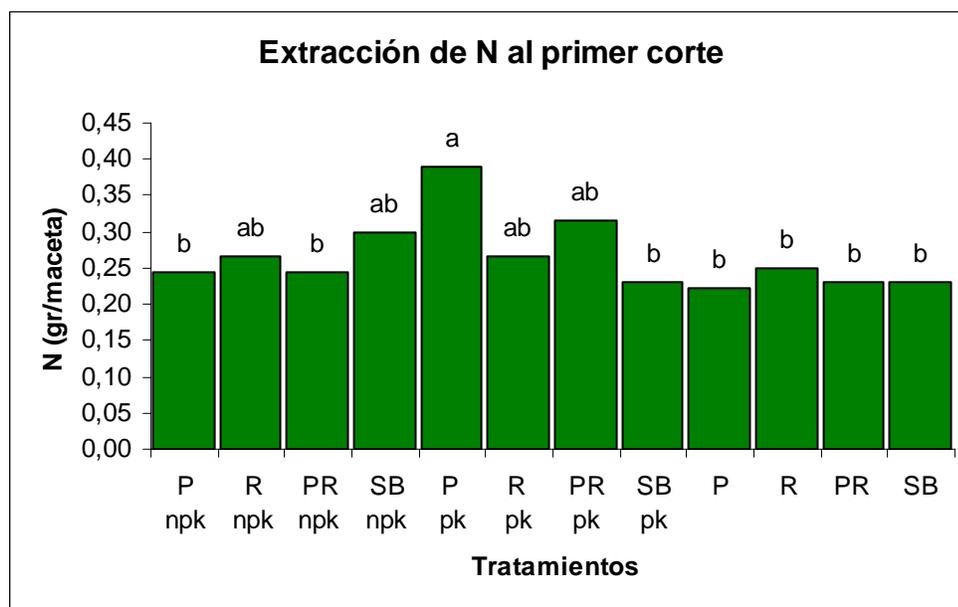
Los resultados obtenidos en el primer corte que fue realizado luego de 120 días luego de la siembra, el día 22 de diciembre 2005, se presentan a continuación en la Figura 6. Se observa que los distintos tratamientos tuvieron resultados estadísticamente significativos en esta primera etapa. De entre ellos se destaca aquellos inoculados con la cepa 2 de *P. agglomerans*. Se puede apreciar que cuando ésta cepa se inocula en macetas sin fertilización mineral nitrogenada (P pk), existe un efecto.

La extracción de N es significativamente mayor que el tratamiento testigo (SB pk) y, de la misma forma, es significativamente mayor que en los tratamientos con fertilización completa (P npk) y sin fertilización (P). Estos dos últimos no presentan diferencias significativas entre ellos. Asimismo, no se evidencian diferencias significativas entre éstos y los tratamientos testigo. Estos resultados, coinciden con las investigaciones realizadas por URZÚA *et al.* 1986, en las cuales se sostiene que la aplicación de P tiene un efecto positivo sobre la fijación de N<sub>2</sub> en trébol blanco creciendo en macetas en suelos tipo andisoles y ultisoles de la X región.

El estudio llevado a cabo por URZÚA *et. al* en 1986, demuestra que a los 90 días, la aplicación de superfosfato triple produce un aumento significativo de la materia seca, nitrógeno acumulado, número de nódulos y actividad de la enzima nitrogenasa.

Por su parte los tres siguientes tratamientos que fueron inoculados con *R. leguminosarum*, (R npk, R pk, R) no arrojan diferencias significativas entre ellos, los testigos, ni con los otros tratamientos. Estos son idénticos a todos los demás tratamientos. No existe un efecto de *Rhizobium* en la acumulación de N en tejidos para esta etapa del cultivo.

En las coinoculaciones realizadas con *P. agglomerans* y *R. trifolii*, (PR npk, PR pk, PR) no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos y con los tratamientos testigos.



**FIGURA 6. Extracción de nitrógeno aéreo en el primer corte en plantas de trébol rosado sometidas a distintas inoculaciones y fertilización.**

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%(TUKEY)

P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria.

n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio.

De los resultados presentados en los párrafos anteriores se desprende que existe un efecto positivo de algunas de las especies de bacterias inoculadas en estudio. *P. agglomerans* produce un aumento en la extracción de N por parte de plantas de trébol rosado en el primer corte, cuando existe fertilización potásica y fosforada. *R. trifolii* no muestra efecto alguno en la extracción de N para esta etapa del cultivo. Esto podría deberse a diversos factores que hacen que esta especie no logre una población adecuada que le permita actuar en beneficio de la planta.

Del mismo modo, la coinoculación de estas cepas para esta etapa del cultivo, (tratamientos PR) muestra que las inoculaciones realizadas con pk son superiores a las alcanzadas con fertilización completa npk y sin aporte. Estos resultados además evidencian que las plantas sin bacterias (SB) pero con aporte de nutrientes completo (npk) se comportan igual que los inoculados. Dejando en manifiesto el efecto positivo de la inoculación.

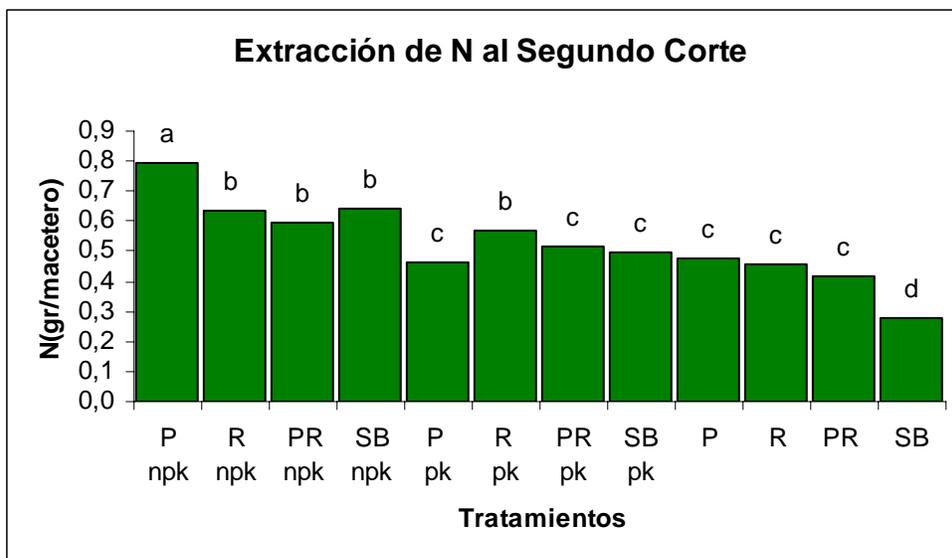
#### **4.2.2 Extracción de nitrógeno al segundo corte.**

Transcurridos 150 días desde la siembra, el día 24 de enero 2006 se efectuó el segundo corte. Los resultados se presentan de manera gráfica en la Figura 7. En esta etapa del ensayo se evidencian resultados, por parte de *P. agglomerans*, totalmente distintos al primer corte, discutido anteriormente. Al observar la figura 7, se distinguen diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con la cepa 2 de *P. agglomerans*. Cuando esta cepa se encuentra bajo fertilización completa, la extracción de N es significativamente mayor que la totalidad de los tratamientos. Al parecer, no existiría en este caso, un efecto depresor de la actividad microbiana por parte del N suministrado. Otra alternativa es que este elemento ya no se encuentre en cantidades importantes en el sistema, debido a pérdidas por lixiviación y desnitrificación. No existen diferencias significativas entre los tratamientos P pk y P. Así mismo, el tratamiento P pk no arroja diferencias significativas con el testigo, el cual no ha sido inoculado (SB pk). El tratamiento sin fertilización es significativamente mayor al testigo sin inocular.

Al observar el grupo de tratamientos inoculados con *R. leguminosarum*, (R npk, R pk y R) y que presentan fertilización mineral, (R npk, R pk) son estadísticamente superiores a aquel que no presenta fertilización (R). Al comparar con los testigos, *R. leguminosarum* sometido a fertilización mineral sin nitrógeno (R pk) y *R. leguminosarum* sin fertilización, (R) son estadísticamente mayores, mientras que el tratamiento con fertilización completa (R npk) no

mostraría un efecto sobre la acumulación de N en los tejidos. Lo anterior estaría relacionado con el conocido efecto depresivo del proceso de fijación simbiótica de nitrógeno, debido a un exceso de N en el suelo (Urzúa *et al.*, 1986).

Cuando se inoculan ambas bacterias, la extracción de nitrógeno en los tejidos es mayor en aquellos tratamientos sometidos a fertilización completa. No hay diferencias significativas entre PR npk y PR. Cuando se compara con los testigos, no existen diferencias significativas entre éstos y los tratamientos PR npk y PR pk, no existe un efecto de las cepas sobre el extracción de nitrógeno, en cambio se observa que la coinoculación de ambas bacterias sin fertilización (PR) es estadísticamente mayor que el tratamiento testigo.



**FIGURA 7. Extracción de nitrógeno aéreo en el segundo corte en plantas de trébol rosado sometidas a distintas inoculaciones y fertilización.**

Letras distintas indican hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0% (Kruskal-Wallis). P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria, n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio.

De los resultados obtenidos en esta fase se puede concluir que en esta etapa del cultivo, *P. agglomerans* logra los más altos niveles de N en tejidos en la planta cuando está tratada con fertilización completa. Ampliamente conocido es el efecto positivo *Rhizobium*-leguminosa, el que se demostró una vez más en esta etapa del cultivo, cuando este se encontraba en presencia de P y K. Al coinocular las cepas existe un efecto positivo en la acumulación de N en los tejidos aéreos cuando no existe fertilización.

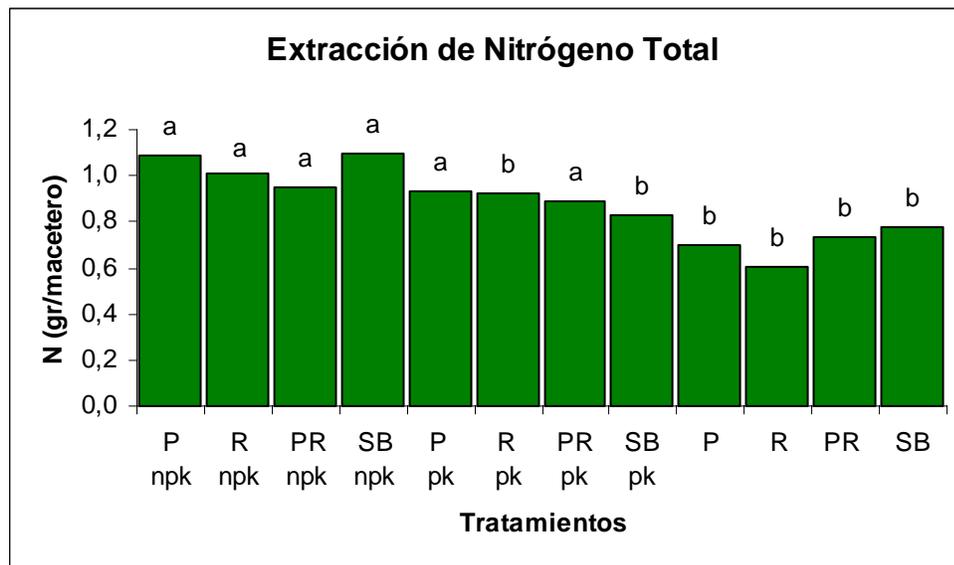
#### **4.2.3 Extracción total de nitrógeno (primer y segundo corte).**

Al analizar los resultados referidos a la extracción de nitrógeno total de ambos cortes, (Figura 8), se pueden establecer diferencias estadísticamente significativas en el grupo de tratamientos inoculados con *P. agglomerans*. Los resultados obtenidos para los maceteros sometidos a fertilización completa (P npk) y aquellos sin fertilización (P), son estadísticamente diferentes. Siendo estos últimos los que obtuvieron menores contenidos de nitrógeno aéreo a lo largo de todo el ensayo.

Al comparar con los testigos, *P. agglomerans* no obtuvo diferencias significativas al estar sometida a fertilización completa y sin fertilización. Existe un efecto de esta bacteria sobre la extracción de nitrógeno, cuando se encuentra fertilizada solo con P y K.

En el caso de la cepa nativa de *R. leguminosarum* no existen diferencias estadísticamente significativas con los testigos. Las plantas inoculadas con esta cepa se comportaron a lo largo de todo el periodo de ensayo de la misma forma que los tratamientos testigo que no fueron inoculados inicialmente.

Al coinocular las dos cepas, es posible establecer diferencias significativas entre aquellos tratamientos sometidos a fertilización con P y K y su testigo. Situación que puede ser atribuible sólo a la especie *Pantoea agglomerans*, relacionando los resultados obtenidos en esta etapa con inoculaciones de esta bacteria solamente. No se evidencian diferencias significativas entre los otros tratamientos y los testigos.



**FIGURA 8. Extracción de nitrógeno total aéreo en plantas de trébol rosado sometidas a distintas inoculaciones y fertilización.**

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5%(TUKEY)

P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria.

n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio.

De lo anteriormente presentado se puede concluir que a lo largo de todo el ensayo, la cepa que demostró un mayor efecto sobre los extracciones de nitrógeno presentes en las partes aéreas de las plantas de *T. pratense*, corresponde a *P. agglomerans*, tanto sola como en coinoculaciones, condicionada a bajos niveles de N en el sistema y buen contenido de P y K.

#### 4.2.4 Extracción de nitrógeno en tejido radical.

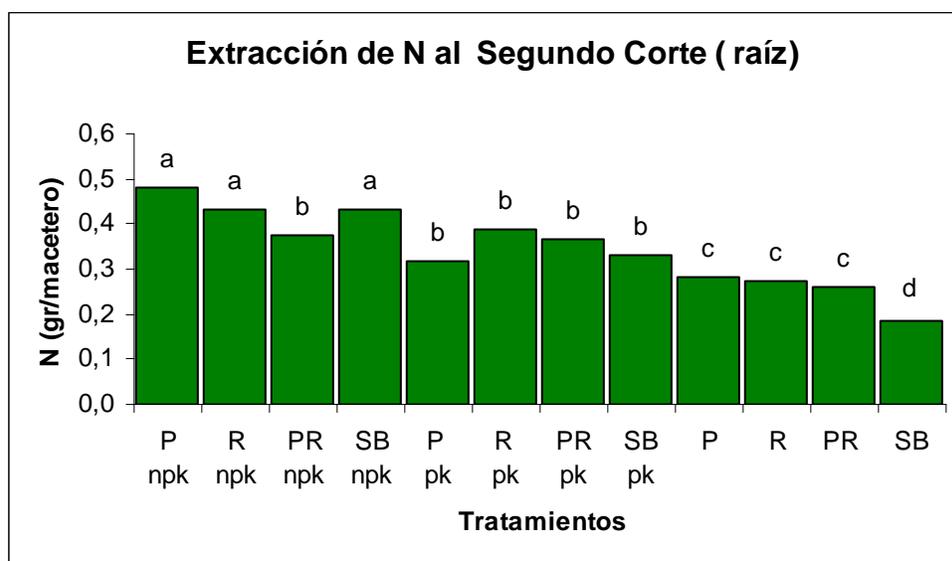
En la Figura 9 se presentan los resultados referidos a la extracción de nitrógeno en la raíz alcanzado por las plantas de trébol rosado. En general, el extracción de este elemento es menor en la raíz que en la parte aérea de la planta, lo que concuerda con los resultados obtenidos por RINCÓN *et al.*, 2000.

Al observar los tratamientos inoculados con *Pantoea*, existen diferencias significativas entre ellos (P npk, P pk y P). Al comparar estos tratamientos con los testigos, es posible establecer diferencias significativas, el extracción de N en los tejidos radicales es mayor cuando se encuentra sin fertilización.

En el caso de los tratamientos inoculados con la cepa nativa de *R. leguminosarum* para los tres tipos de fertilización, existen diferencias significativas. Con fertilización completa, esta cepa obtiene los mayores contenidos de N en los tejidos, siendo estadísticamente superior a los otros dos tratamientos (R pk y R). Estos últimos son, distintos entre sí, siendo superior estadísticamente aquel fertilizado con P y K. Al comparar con los testigos, existen diferencias significativas, ya que la extracción de N en los tejidos radicales es mayor cuando *R. leguminosarum* se encuentra sin fertilización, que en el respectivo testigo.

Al combinar las cepas e inocularlas, existen diferencias significativas en cuanto al extracción de nitrógeno radical. Ambas bacterias sometidas a fertilización completa, arrojan resultados estadísticamente inferiores al testigo con fertilización completa. En este caso las bacterias inoculadas al mismo tiempo, sometidas a fertilización completa, se interfieren. Esta situación se debería al conocido efecto depresor de la actividad microbiana que tiene la fertilización nitrogenada.

Cuando la coinoculación ocurre sin fertilización (PR), es significativamente mayor que el testigo sin inocular. Se puede afirmar que existe un efecto positivo de estas bacterias combinadas, en la acumulación de nitrógeno en tejido radicular de las plantas cuando estas no se encuentran bajo fertilización mineral alguna.



**FIGURA 9. Extracción de nitrógeno radicular en el segundo corte en plantas de trébol rosado sometidas a distintas inoculaciones y fertilización.**

Letras distintas indican hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0% (Kruskal-Wallis).

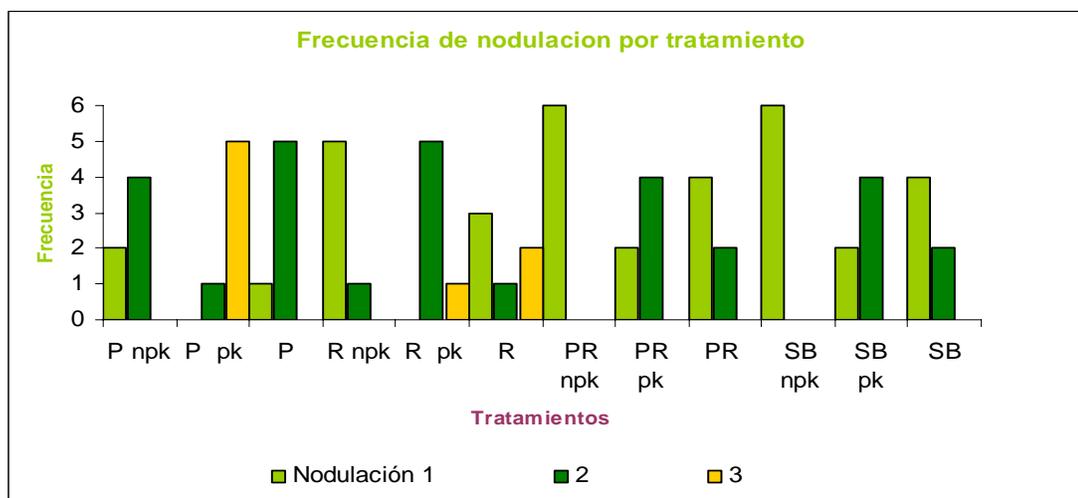
P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria.

n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio.

De lo presentado en los párrafos anteriores, es posible concluir que existe un efecto positivo en la acumulación de N en los tejidos radicales de *T. pratense*, por parte de *P. agglomerans* cuando se inocula a sustratos sin fertilización. Ocurre de la misma manera con *R. leguminosarum*, ya que se obtienen los mas altos niveles de N en la raíz al inocular esta cepa en un sustrato sin fertilización. Al coinocular, se obtiene el mismo efecto que en los dos casos anteriores, en la misma situación de fertilización. Lo que pone en evidencia la fijación de este elemento por parte de ambas bacterias en situaciones de baja fertilización.

### 4.3 Efecto de la inoculación de bacterias *P. agglomerans* y *R. trifolii* en plantas de trébol rosado, sobre la nodulación.

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos de las inoculaciones de plantas de trébol rosado con las cepas en estudio, medidos al segundo corte en las raíces según la escala de nodulación.



**FIGURA 10** Nodulación según escala para los distintos tratamientos al segundo corte.

P: *P. agglomerans*, R: *R. leguminosarum*, PR: *P. agglomerans* y *R. leguminosarum*, SB: Sin bacteria. n: nitrógeno, p: fósforo, k: potasio

Al calificar mediante la escala de nodulación, se obtuvo notas para cada macetero, las cuales fueron llevadas a una tabla de frecuencia.

**CUADRO 4.** Tabla de frecuencia de nodulación en plantas de *T. pratense* cultivar Quiñequeli.

Nodulación	Frecuencia	%	% Acumulado
1	35	48,6	48,6
2	29	40,3	88,9
3	8	11,1	100

Un 49% del total de las macetas, no presentó nodulación alguna. Un 40% presenta pocos nódulos, pequeños y blancos. El 11% restante, presenta pocos nódulos medianos y con coloración.

Se puede distinguir que los tratamientos *R. leguminosarum* sometido a fertilización potásica y fosforada, *P. agglomerans* sometido a fertilización potásica y *R. leguminosarum* sin fertilización fueron los únicos que presentaron nodulación del tipo 3, es decir, pocos nódulos, medianos y con color. El P es un elemento necesario para las leguminosas, ya que está vinculado con el sistema energético de la planta, transportando energía para una buena simbiosis *R. leguminosarum*-leguminosa, y en consecuencia una buena nodulación (RAZZ et al., 1994).

Es posible que, a pesar de las condiciones de esterilidad iniciales, haya existido algún tipo de contaminación con *R. leguminosarum* a algunos maceteros que sólo contenían *P. agglomerans* a través del riego u otros manejos.

La mayoría de los tratamientos, presentó nodulación del tipo 1 y 2, es decir, escasa o nula, pequeños e inactivos.

Los tratamientos sometidos a fertilización completa fueron los que presentaron más baja y peor nodulación. Esto coincide con los resultados obtenidos por Razz et al., (1994) La aplicación de N afectó el número de nódulos de *Leucaena leucocephala*, disminuyendo con los niveles de N aplicados. Similares respuestas fueron obtenidas por Eaglesham et al., (1982) y trabajando con *Vigna unguiculata*. Es posible afirmar que dosis elevadas de nitrógeno afectan la nodulación y como consecuencia, la fijación biológica de nitrógeno.

## 5 CONCLUSIONES

El comportamiento de *P. agglomerans* atrapada en matrices gelificadas de alginato e inoculada a la rizósfera de *T. pratense* bajo condiciones controladas, fue benéfico para la planta. Esta cepa logró colonizar la rizósfera y fue capaz de llevar a cabo procesos que vieron medianamente incrementado los contenidos de N y MS tanto en la parte aérea como radical de *T. pratense*.

Por su parte, el desempeño de *R. leguminosarum* no fue óptimo. Esta especie no demostró su conocido potencial como bacteria fijadora de nitrógeno, ya que no colonizó la rizósfera de la manera esperada.

Es posible establecer un efecto positivo de las cepas bioatrapadas sobre el crecimiento de la planta. Al conocido efecto de *R. trifolii*, se agrega un efecto promotor de crecimiento por parte de *P. agglomerans* cuando esta cepa se encuentra con niveles adecuados de P y K.

Los resultados obtenidos no indican que el efecto producido por las cepas estudiadas sea sinérgico. Estas tampoco se interfieren. Ambas cepas son independientes y no influyen entre sí.

Existe una importante relación entre el aporte que realiza la fertilización y la acción de las cepas estudiadas. Buenas condiciones de fertilidad, en general, promueven la acción de ambas. Altas dosis de N inhiben la acción bacteriana.

Es posible afirmar que la acción de *P. agglomerans*, permitiría, disminuir el suministro de fertilización nitrogenada en siembras de *T. pratense*.

## 6 RESUMEN

La fertilización en un cultivo es esencial para una buena producción, sin embargo, constituye la mayor parte de la inversión total. El uso desmedido de fertilizantes químicos, puede provocar contaminación. La fijación biológica de nitrógeno, llevada a cabo por microorganismos de la rizósfera, constituye una alternativa sustentable.

Esta investigación se basa en la siguiente hipótesis: cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* F. y *Pantoea agglomerans* B., al ser inoculadas a la rizósfera, promueven el crecimiento en trébol rosado cv. "Quiñequeli". El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de bacterias inoculadas a la rizósfera de plantas de *Trifolium pratense*.

Cepas de *R. leguminosarum* y *P. agglomerans*, se aislaron y multiplicaron en laboratorio, para luego ser encapsuladas en matrices de alginato, lo que permitió su inoculación al sustrato junto a *T. pratense*. Después de cuatro meses se realizó el primer corte, al quinto mes se realizó el segundo. Se efectuaron análisis de nitrógeno (N) y materia seca (MS) y se midió la nodulación. Esto se hizo en la parte aérea en ambos cortes y en la raíz para el segundo corte.

## SUMMARY

Crop nutrient management is essential for agricultural production; nevertheless, it constitutes a mayor part of the overall production cost. The excessive use of chemical fertilizers may cause contamination. The biological nitrogen fixation, wich is carried out by microorganisms in the rizosphere, constitutes a sound alternative.

This investigation is based upon the following hypothesis: The growth of *Trifolium pratense* cv. "Quiñequeli" is enhanced when the soil is inoculated with selected strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* F. and *Pantoea agglomerans* B. The general objective of this work is to evaluate the effect of both bacterias inoculated at the rizosphere of *Trifolium pratense*.

*R. leguminosarum* and *P. agglomerans* strains were isolated and multiplied in laboratory, to be later encapsulated in alginate beads, which allowed its inoculation to the *T. pratense* substrate. The first cut was performed four months after sowing, and the second one was carried out one month later. For the first cut, only the nitrogen (N) and dry matter (DM) content of the aerial part was measured whereas, for the second cut, N and DM content of both the shoot and the root was analyzed and the nodulation was evaluated by means of a visual scale.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- AYANABA, A. y DART, P. 1977. Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. New York, 215 p.
- AZOCAR C. y OYARZO V. 1974 Reservas orgánicas nitrogenadas (ron) en trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Agro Sur, Vol. 2, No. 2, pp. 45-49. ISSN 0304-8802.
- AZOCAR, C. y BRITO, G. 1974. Influencia de los sistemas de corte en la producción de forraje del trébol rosado sembrado solo y en mezcla con ballica de rotación corta. Agro Sur (Chile) 2(1): 6-12.
- BALDANI, J., CARUSO, L., BALDANI, V..., GOI, S. y DÖBEREINER, J. 1997. Recent advance in BNF with non-legume plant. Soil Biol. Biochem. 29, 911-922.
- BASHAN, Y., 1998 Inoculants of Plant Growth Promoting Bacteria for use in Agriculture. Biotechnology Advances Vol.16, N°4 pp: 729-760.
- BASHAN, Y., HERNANDEZ, J., LEYVA, L. y BACILIO, M., 2002 Alginate micro beads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. Biology and Fertility of Soils, Springer Berlin / Heidelberg, Vol. 35, N° 5 pp: 359 - 368

- BEIJI, A., MERGERT, J., GAVINI, F., IZARD, D., KERSTERS, K., LECLERS, H. y DELEY, J. 1988 Subjective synonym of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. Int. J Syst. Bacteriol. 38 pp: 77-88.
- BERNIER, R. 1988 Praderas para Chile, Ignacio Ruiz N. INIA Ministerio de Agricultura, Santiago de Chile, 634 p.
- BUCHANAN, R. y GIBBONS, N. 1975 Bergey's manual of determinative bacteriology, Baltimore, Williams y Wilkins 1268 p.
- BURNS, R. y HARDY R., 1975 Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Mol Biol Biochem Biophys. N° 21, pp: 1-189
- CHILE, CORPORACIÓN DE FOMENTO. CORFO, 1982 Manual de forrajeras y cultivos industriales. Publicación Ciren N° 31, Santiago, Chile, 61 p.
- CROZIER, A., ARRUDA, P., JASMIN, J., MONTEIRO, A., y SANDBERG, G. 1988 analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2833-2837.
- CUEVAS, E. y BALOCCHI, O. 1983 Producción de forraje. Serie B-7 Instituto de Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia 201p.
- DÖBEREINER, J. y PEDROSA, F. 1987 Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Estados Unidos, Science Tech Publishers. 155p.

- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J. y OKON, Y. 2003 Plant-Growth Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22: 107-149.
- EDWARDS, J., BAQUE, E., y TANG, J. 2004 Proposal to acknowledge Beijerinck as the original author of the species *Pantoea agglomerans*. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, 54, 2437.
- EAGLESHAM, A., AYANABA, A. RANGA, V. y ESKEW D. 1982. Mineral N effects on cowpea and soybean crops in a Nigerian soil. Development, nodulation acetylene reduction and grain yield. *Plant and Soil*. 68(12):171-181.
- EWING, W. y FIFE, M. 1972 *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (The Herbicola-Lathyri bacteria). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22, 4-11.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN. FAO, 1985 Inoculantes para leguminosas y su uso. Italia, Roma 61 p.
- GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEIJI, A.; MIELCARECK, C.; IZARD, D.; KERSTERS, K. y DE LEY, J. 1989 Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing & fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriology*. 39, pp:337-345.
- GLICK, B. R., PATTEN, C. L., HOLGUIN, G. y PENROSE, D. M. 1999 Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria., London, Imperial College Press. 270 p.

- JIMÉNEZ, R., VIRGEN, G., TABARES, S. Y OLALDE V., 2001 Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y Perspectiva vol. 20 México, pp: 395-400
- MAYZ-FIGUEROA, J., 2004 Fijación biológica de nitrógeno. Revista científica UDO Agrícola México, Vol. 4 , N° 1, pp: 1-20
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER, J. 1997. Brock Biología de los microorganismos. México. Prentice Hall Iberia, 986 p.
- MERBACH, W., RUPPEL, S. y SCHULZE, J. 1998. Dinitrogen fixation of Microbe-Plant Associations as Affected by Nitrate and Ammonium Supply. Isotopes in Environmental and Health Studies. 34: 67-73.
- NUTMAN, P.S. (ed). 1916. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge, Cambridge University Press. pp: 239-253,255-269.
- POSTGATE, J. 1990 Nitrogen Fixation. New Studies in Biology. Londres, Inglaterra. Edward Arnold 69 p.
- PRASAD, G., EVAN, K., NATARAJAN, M., PALLAVOLU, M., REINHOLD-HUREK, B. y LADHA, J. 2001 Entophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. J. Bacteriology. N° 183 pp:2634-2645.
- SMIDSRÖD, O. y SKJAK-BRAEK, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends biotechnology. Mar; 8(3) pp: 71-8.

- RAZZ, R., CLAVERO, T., PEREZ, J.J., GONZÁLEZ, L. y GIURDANELA, J. 1994 Efecto de la fertilización con N y P sobre la nodulación de 2 ecotipos de *Leucaena leucocephala*. Rev. Fac. Agron. N°12 pp: 187-192
- RINCÓN, J. J., CLAVERO, T., RAZZ, R., PIETROSEMOLI, S., MENDEZ-CASTRO, F., NOGUERA, N., 2000. Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación biológica de nitrógeno en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) of Wit). Rev. Fac. Agron., N°17, p: 342-357
- ROVIRA, A. 1973 Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. Pestic. Sci., N°4 pp: 361-366.
- SCHOEBITZ, M. 2006 Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.) Tesis Lic. Ag. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 77p.
- STANIER, R.; INGRAHAM, J.; WHEELIS, M. y PAINTER, P. 1996. Microbiología, Segunda edición Barcelona, España. Editorial Reverte, SA 749p.
- TAIZ, L. y ZEIGER, E. 2002 Plant Physiology, Sunderland Massachusetts Sinauer Associates, Inc., Publishers 660 p.
- TEUBER, N. 1980. Especies y variedades forrajeras para la Décima Región. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Remehue. Boletín Divulgativo N° 72. Osorno, Chile. 11p.

- TORRES, A. 1991. Producción y utilización de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) Torres A. y Dumont J.C. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Remehue, Serie Remehue N° 13, Osorno, Chile 98 p.
- URZÚA, H., 2005. Beneficios de la fijación simbiótica de Nitrógeno en Chile. Ciencia e Investigación Agraria 32(2) P133-150
- URZÚA, H.; PINILLA, H. y M. RUIZ. 1986. Factores de suelo limitantes de la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> en praderas de la zona sur de Chile. Ciencia e Investigación Agraria N°13 (3) pp: 257-262
- VERMA, S., LADHA, J. Y TRIPATHI, A. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep-water rice. J. Biotechnoly N°91 pp: 127-141.

**ANEXOS**

**ANEXO 1. Agar papa dextrosa.**

39 g          APD Merck

1L            Agua destilada

Disolver, mezclar y autoclavar.

**ANEXO 2. Caldo papa dextrosa**

500 g de papas

1 litro de agua

10 g dextrosa

Poner a hervir las papas hasta que se desarmen en el agua, pasar por un cedazo fino, agregar dextrosa. Autoclavar.

### **ANEXO 3. Pruebas de Identificación C2 *Pantoea agglomerans*.**

Las pruebas realizadas para identificar debidamente las cepas fueron:

#### **Tinción de Gram**

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Cristian Gram, que desarrolló la técnica en 1844. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

Recoger muestra estéril. Hacer el extendido en espiral. Dejar secar a temperatura ambiente. Fijar la muestra al calor (flameando 3 veces aprox.). Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas. Enjuagar con agua. Agregar lugol y esperar 1 minuto. Enjuagar con agua. Agregar alcohol y acetona y esperar 15 segundos. Enjuagar con agua. Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas. Enjuagar con agua.

Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión

#### **Prueba de la Oxidasa**

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo

(Continúa)

(Continuación Anexo 3)

Se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno (ver prueba de la catalasa) que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo de Kovacs). Es menos tóxico y mucho más sensible que el correspondiente compuesto dimetilo (reactivo de Gordon y McLeod), pero es más caro. Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negrusco intenso.

Método en placa directa

Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla. Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 segundos, mientras que con el de Gordon y McLeod es dentro de los 10-30 minutos.

Método indirecto sobre papel

Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aprox. en una placa de Petri. Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel. Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado. La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

#### **ANEXO 4. Agar/Caldo rojo Congo Manitol**

Manitol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,7 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Extracto de levadura	10 g
Agar*	16 g
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH 6,8-7,2 .Esterilizar 1 atm por 15 minutos.

Al preparar agar, este debe tener un indicador para *Rhizobium*, rojo congo.Preparar una solución estéril de rojo congo filtrando por un filtro milipor de 0,2 mm y se recibe filtrado en un matraz aforado de 100 mL. Agregar frío 2,5 mg de rojo congo al 1%.

\* Eliminar agar al preparar caldo

#### **ANEXO 5. Alginato**

500 mL de Caldo papa fresco

Alginato de Na al 2 %

Almidón soluble 1%

Pectina 1%

Betaína al 1%

Celite Diactiv 17 C al 0, 5%

Molibdeno

Se le agrega al caldo papa dextrosa, el alginato, luego la pectina. Se agita muy bien y se calienta, cuando se solubiliza, luego de 60 minutos aprox, se deja enfriar y se le adiciona el almidón soluble, betaína , Celite y Mo, se agita nuevamente, es importante que no hierva ya que el alginato se despolimeriza rápidamente con altas temperaturas. NO AUTOCLAVAR.

## **ANEXO 6. Recuento de UFC**

A partir de una muestra de 1mL del homogeneizado, de densidad óptica 1 a 600 nm, medida en el espectrofotómetro, se hizo 14 diluciones en tubos con 5 mL de agua destilada estéril. Sacando con micropipeta 1mL de la muestra, quedando 14 diluciones desde  $1 \times 10^{-2}$  hasta  $1 \times 10^{-15}$ .

Para efectuar el recuento de unidades formadoras de colonia por cápsula fue necesario usar dos métodos, partiendo de las diluciones obtenidas.

a) Siembra directa: De cada dilución obtenida, se siembra una placa de agar Mc Konkey, con un rastrillo de vidrio.

b) Inclusión en Agar: Se preparan 15 mL de agar manitol repartido en 28 tubos (dos repeticiones por dilución). En cada placa se pone 1mL de la muestra y 15 mL de agar, se tapa y agita suavemente para que la muestra quede mezclada con el agar.

Luego de incubar las muestras por 24 h se procedió a hacer el recuento en el contador de colonias o “colony counter” del laboratorio de fitopatología.

## ANEXO 7. Cálculos de fertilización

### Nitrógeno, fuente Nitrato de Sodio

150 Kg. N/ha ---16% N = 93,8 kg/ha

93,8 kg/ha – 1.400.000 Kg

X - 4 Kg

X = 2,68 g por macetero.

### Fósforo, fuente Superfosfato triple

300 Kg. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha ---46% P = 652 kg/ha

652 kg/ha – 1.400.000 Kg

X - 4 Kg

X = 1,86 g por macetero.

### Potasio, fuente Muriato de K

200 Kg. K<sub>2</sub>O/ha ---60% K = 333,3 kg/ha

333,3 kg/ha – 1.400.000 Kg

X - 4 Kg

X = 0,95 g por macetero.

### Azufre, fuente Fertiyeso

300 kg/ha – 1.400.000 Kg

X - 4 Kg

X = 0,857 g por macetero.