

UTILIZACION DE RESIDUOS DE LEGUMINOSAS COMO
ABONO VERDE

II. INCIDENCIA SOBRE LA MICROFLORA Y DIVERSOS
FENOMENOS ANTAGONICOS DEL SUELO REFERIDOS
A AZOBACTER

J. A. OCAMPO, F. GALLARDO-LARA, B. VITORINO*, M. AZCON



PUBLICADO EN
ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA
TOMO XXXIX, NÚMS. 9-10 — MADRID, 1980

FERTILIDAD DE SUELOS

UTILIZACION DE RESIDUOS DE LEGUMINOSAS COMO ABONO VERDE

II. INCIDENCIA SOBRE LA MICROFLORA Y DIVERSOS FENOMENOS ANTAGONICOS DEL SUELO REFERIDOS A AZOBACTER

por

J. A. OCAMPO, F. GALLARDO-LARA, B. VITORINO*, M. AZCON

SUMMARY

UTILIZATION OF LEGUMINOUS PLANT RESIDUES AS GREEN MANURE.
II. EFFECT ON SOIL MICROFLORA AND ON SEVERAL ANTAGONISTIC
MECHANISMS TOWARDS AZOTOBACTER

The effect of green manure on total microbiota, number of soil fungi and on several antagonistic mechanisms of the soil towards *Azotobacter* has been tested.

Green manure not only increases total microbiota, soil fungi and *Azotobacter* populations, but also increases antagonistic microorganisms and soil bacteriostasis, which acted at different sequential times along the experiment, towards *Azotobacter*. *Azotobacter* populations were always higher in green manure treatment (especially in Alfalfa treatments) than in the control. Thus, the possibility of using green manure as source of energy for *Azotobacter* could be successful for the assay of such microorganisms as «bacterial fertilizer».

INTRODUCCIÓN

Dentro del tema de la fertilización orgánica del suelo, un aspecto que ha suscitado el interés de la investigación ha sido el estudio del efecto que la adición de materiales orgánicos provoca sobre la actividad biológica del suelo en sus distintas facetas (Gaur *et al.*, 1971; Pokorná-Kozová y Novák, 1971; Strzelczyk y Sitek, 1972; Gallardo-Lara *et al.*, 1973; Keim *et al.*, 1975). En este sentido, los estudios sobre abono verde no constituyen una excepción, pues se ha estudiado su influencia sobre microflora total y otros grupos específicos de microorganismos (Rouatt y Lochhead, 1955; Haban y Prokopova, 1966; Mishra *et al.*, 1973; Ramaswami y Raj, 1973), así como su capacidad de supresión o

* Dirección actual: Departamento de Agricultura, Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cuzco, Perú. Participó en este trabajo con motivo de su estancia en la Estación Experimental del Zaidín, becado por U. N. E. S. C. O - C. S. I. C.

disminución de patógenos de plantas en suelos infectados (Singh y Pandey, 1966; Forbes, 1974). A veces incluso se ha profundizado en el estudio de aspectos específicos tales como la alteración de la actividad fungistática del suelo como consecuencia de la adición de estos materiales (Selcuk y Grossmann, 1967; Schulz, 1968).

En otro orden de cosas, guardando bastante similitud con la actividad fungistática antes mencionada, recientemente se ha puesto de manifiesto otra forma de antagonismo microbiano denominada bacteriostasis (Brown, 1973; Davis, 1975-1976; Barea *et al.*, 1978; Ocampo *et al.*, 1978). Profundizar en un conocimiento más exacto de éste y otros fenómenos de antagonismo microbiano, como pueden ser los de vía competitiva, puede resultar de gran utilidad de cara al éxito en la utilización de microorganismos como «fertilizantes bacterianos», especialmente *Azotobacter*, ya que podía pensarse que los materiales verdes podían constituir un soporte adecuado para lograr una persistencia de estos inóculos. Ello sugiere que un estudio acerca de la influencia del abonado verde sobre la evolución de la microflora total y microflora fúngica del suelo y sobre diversos fenómenos de antagonismo microbiano referidos a *Azotobacter*, de lo que no se conoce bibliografía alguna al respecto, así como su interrelación entre ambas, debe de resultar de interés tanto desde el punto de vista básico como aplicado.

MATERIAL Y MÉTODOS

El abonado verde fue preparado en macetas según el método descrito por Gallardo-Lara *et al.* (1980), utilizándose los tratamientos siguientes:

- 1.—Suelo testigo (T)
2. Suelo más fósforo (T + P)
- 3.—Suelo más Alfalfa (A)
- 4.—Suelo más Alfalfa más fósforo (A + P)
- 5.—Suelo más Haba (H)
- 6.—Suelo más Haba más fósforo (H + P)

Estos tratamientos se incubaron a temperaturas de 27° C, realizándose los recuentos microbiológicos periódicamente a las 48 horas, y a las 2, 4, 6 y 8 semanas, siguiendo el modelo estadístico adecuado.

Determinaciones microbiológicas

Para el recuento de microflora total y fúngica se utilizaron los medios descritos por Ocampo (1976) (medio L) y Pochon y Tardieux (1962), respectivamente. El número de *Azotobacter* se contó mediante el método utilizado por Ocampo (1976).

La determinación de los microorganismos amensalistas frente a células de *Azotobacter* en crecimiento (microorganismos productores de antibióticos) y en reposo (microorganismos productores de enzimas líticas) se realizaron según las técnicas descritas por Ocampo *et al.* (1978 a ó b), y finalmente el factor bacteriostático del suelo frente a *Azotobacter* se determinó mediante la técnica basada en la utilizada por Brown (1973) y según la describen Barea *et al.* (1978).

RESULTADOS

Las figuras 1 y 2 muestran que las poblaciones de *Azobacter* y microflora total fueron superiores al comienzo del experimento (48 horas) en los tratamientos controles (T) y (T + P) que en los que se aplicó abono verde ((A), (A + P), (H) y (H + P)). Pero, a partir de la segunda semana, en todos los tratamientos en los que se adicionó abono verde, la población de *Azotobacter* (Figura 1) y de la microflora total (Figura 2) aumentaron, siendo superiores a los controles ((T) y (T + P)). Posteriormente, las poblaciones de *Azotobacter* y microflora total fueron disminuyendo, para mantenerse constantes desde la segunda se-

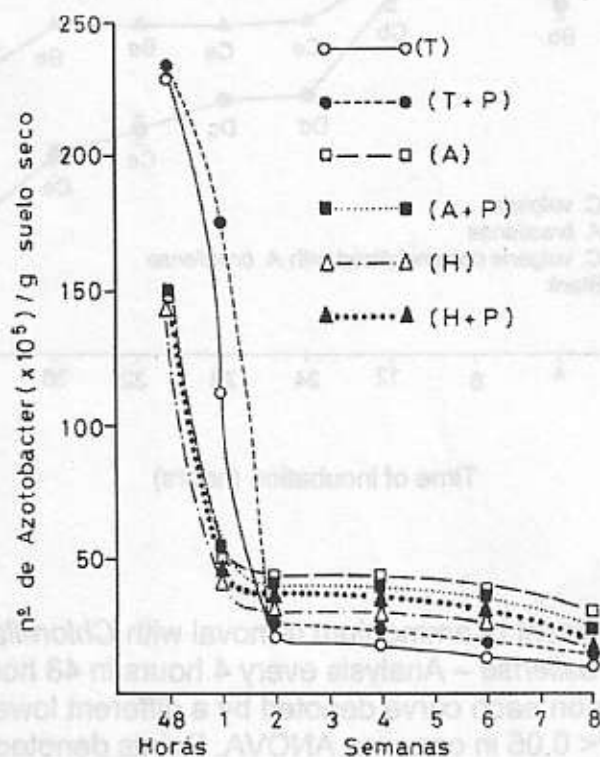


Fig. 1.—Evolución de la población de *Azotobacter* a lo largo del ensayo. Tratamientos aplicados: (T) = Suelo testigo; (T + P) = Suelo testigo más fósforo; (A) = Suelo adicionado con alfalfa; (A + P) = Suelo adicionado con alfalfa más fósforo; (H) = Suelo adicionado con Haba; (H + P) = Suelo adicionado con Haba más fósforo.

mana hasta el final del experimento, permaneciendo superiores a los tratamientos controles, sobre todo en los tratamientos en los que se utilizó alfalfa como abono verde ((A) y (A + P)).

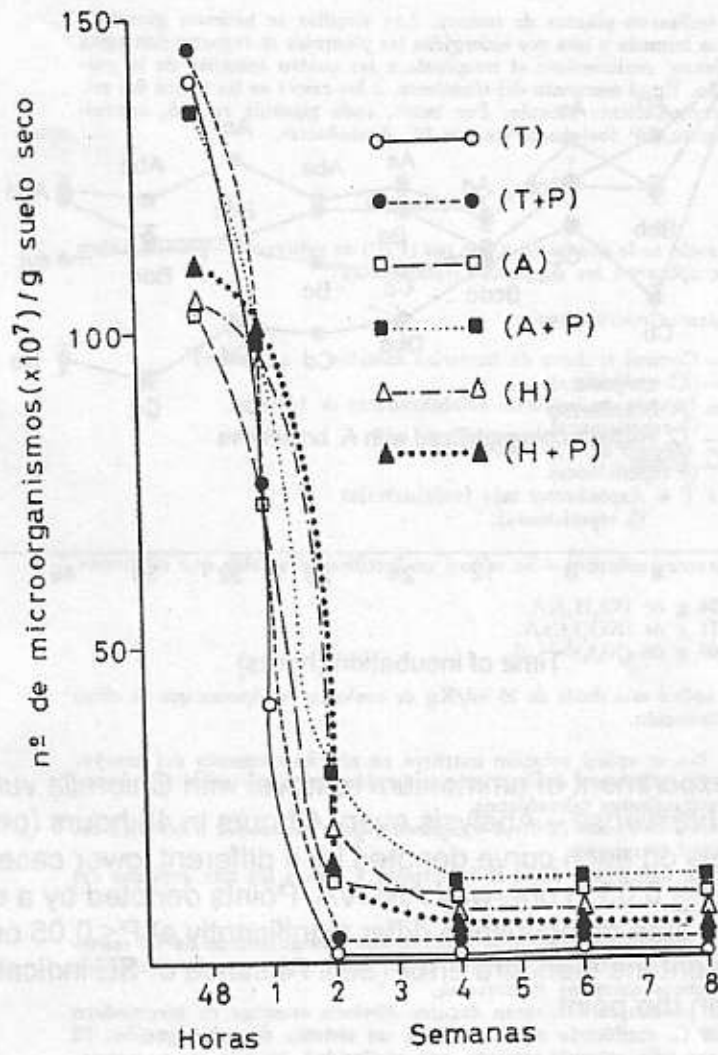


FIG. 2.—Evolución de la microflora total a lo largo del ensayo. Tratamientos aplicados: Los mismos que en la fig. 1.

La población fúngica (Figura 3) fue siempre superior en los tratamientos en los que se adicionó abono verde (A), (A + P), (H) y (H + P), que en los controles, observándose que la adición de fósforo al abono verde, tratamientos (A + P) y (H + P), hace disminuir la población fúngica a partir de la segunda semana.

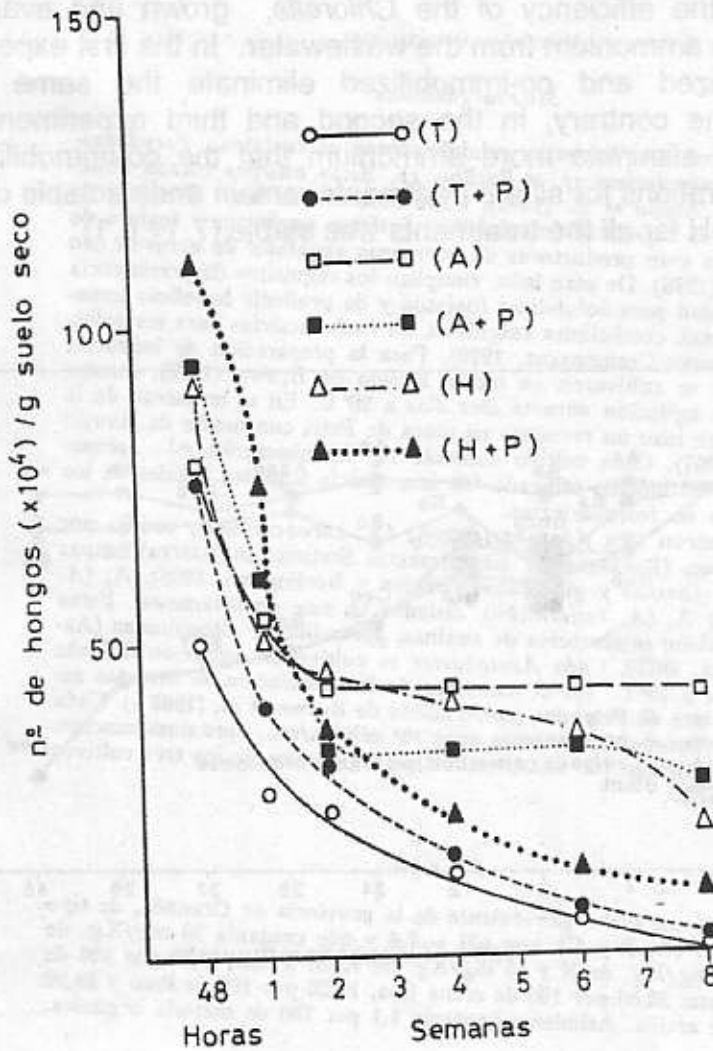


FIG. 3.—Evolución de la microflora fúngica a lo largo del ensayo. Tratamientos aplicados: Los mismos que en la fig. 1.

Los microorganismos amensalistas, tanto los productores de sustancias antibióticas (Figura 4) como los productores de sustancias líticas (Figura 5) fueron siempre superiores en los tratamientos con abono verde (A), (A + P), (H) y (H + P), que en los controles (T) y (T + P). En ambos casos, se observa que el número de microorganismos es elevado al comienzo del experimento, produciéndose un incremento acentuado de microorganismos productores de antibióticos en la primera semana, pero a partir de aquí, tanto los microorganismos amensalistas productores de antibióticos (Figura 4) como los productores

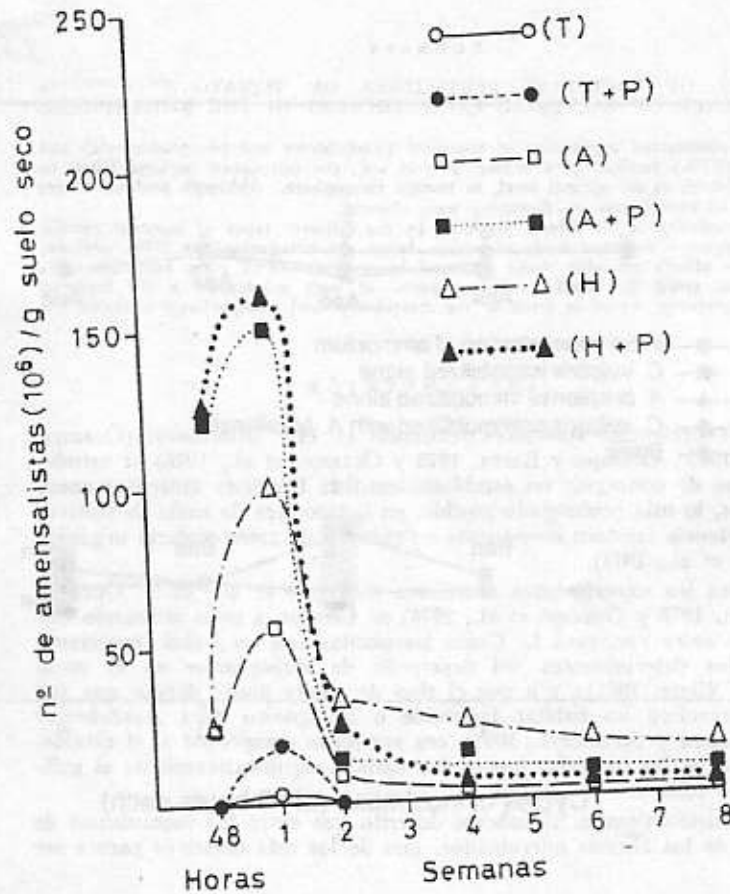


FIG. 4.—Evolución de la población de microorganismos amensalistas frente a *Azotobacter* a lo largo del ensayo. Tratamientos aplicados: Los mismos que en la figura 1.

de enzimas líticas (Figura 5) disminuyen par irse manteniendo constantes a partir de las 2.^a-4.^a semanas.

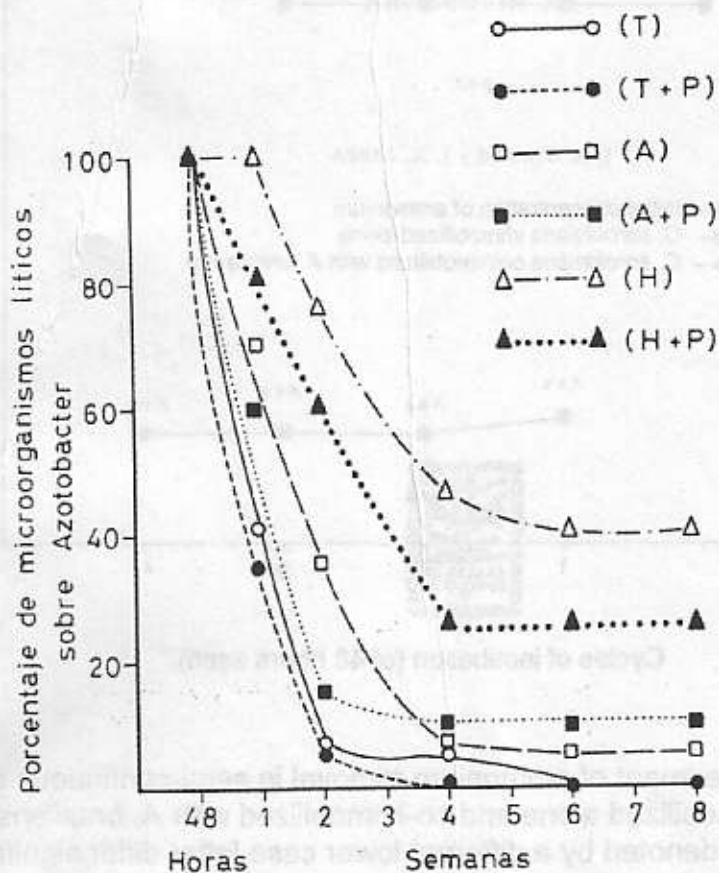


FIG. 5.—Evolución de los porcentajes de microorganismos con actividad lítica sobre *Azotobacter* a lo largo del ensayo. Tratamientos aplicados: Los mismos que en la figura 1.

El factor bacteriostático del suelo (Figura 6) permanece constante en los tratamientos controles, excepto en el control al que se le adicionó fósforo (T + P), en el que se produce una disminución en la sexta semana. Sin embargo, en los tratamientos en los que se aplicó abono verde, se produce un incremento de la bacteriostasis al comienzo del experimento, alcanzando un máximo entre las 2.^a y 4.^a semanas, para disminuir drásticamente a partir de la sexta semana.

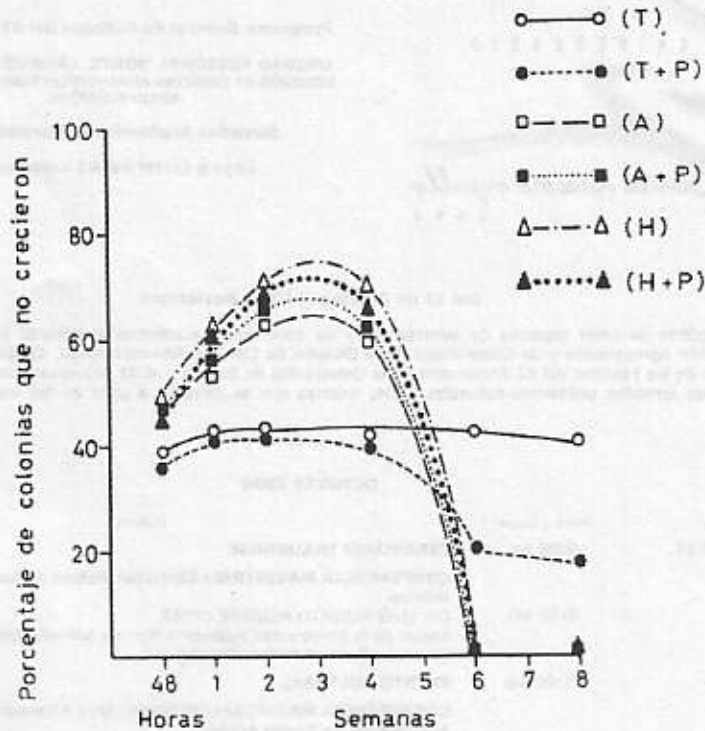


FIG. 6.—Evolución de la bacteriostasis del suelo frente a *Azotobacter*, a lo largo del ensayo, expresada como tanto por ciento, con respecto al testigo, de las colonias que no consiguieron crecer. Tratamientos aplicados: Los mismos que en la figura 1.

DISCUSIÓN

Como se desprende de los resultados expuestos anteriormente, si bien la aplicación de abono verde produce un incremento en la población de *Azotobacter*, también favorece la producción de microorganismos antagonistas, haciendo que estos *Azotobacter* disminuyan.

La adición de abono verde incrementa la microflora total y fúngica, como cabía esperar, durante el periodo de incubación, ya que estos materiales verdes son más fácilmente descomponibles y, por tanto, asimilables por los microorganismos que los materiales secos (Laura, 1975). Sin embargo, también se produce un incremento de los factores antagonísticos frente a *Azotobacter*, y de hecho se observa que la población de microorganismos amensalistas y el factor bacteriostático del suelo aumentan poco después de lo ha hecho la población de

Azotobacter, produciendo un antagonismo tal que hace que la población de *Azotobacter* disminuya posteriormente.

No se puede precisar que haya un solo factor antagónico decisivo frente a *Azotobacter*, sino que todos los factores actúan colaborando en la disminución de éste, aunque la secuencia de su actuación es distinta, pues al principio del experimento actúan más claramente los microorganismos amensalistas (durante la primera semana).

Pero posteriormente el factor bacteriostático del suelo es el que tiene una acción preponderante (durante el período de la segunda a la cuarta semana), aunque disminuye después de una forma drástica como consecuencia de la producción de nutrientes minerales (Barea *et al.*, 1978) por el abono verde (Gallardo-Lara *et al.*, 1980).

Sin embargo, los microorganismos amensalistas productores de enzimas líticas se mantienen en un nivel elevado a lo largo del experimento, por lo que probablemente son los que tengan una acción antagónica más efectiva.

A pesar de que el abono verde favorece la acción de microorganismos antagonistas, la adición de estos materiales verdes hace que la población de *Azotobacter* se mantenga siempre a unos niveles superiores a los tratamientos controles, sobre todo en los tratamientos en los que se adicionó alfalfa. Resulta, pues, evidente, que estos materiales verdes constituyen una fuente energética eficiente para la supervivencia de los *Azotobacter*, y puede, por tanto, pensarse en el empleo de estos materiales como soporte de dichos microorganismos cuando se aplican como «fertilizante bacteriano».

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación subvencionado por la Comisión Asesora Investigación Científica y Técnica (1976).

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto del abonado verde sobre microflora total, población de hongos microscópicos y sobre varios fenómenos de antagonismo del suelo frente a *Azotobacter*.

El abono verde no sólo produce un incremento de la microflora total, población de hongos y de *Azotobacter*, sino que también incrementa la acción bacteriostática del suelo y el número de microorganismos amensalistas, factores que parecen actuar de forma secuencial frente a *Azotobacter*. No obstante, las poblaciones de *Azotobacter* se mantuvieron siempre superiores en los tratamientos en los que se aplicó abono verde (especialmente cuando se aplicó alfalfa), que en los controles, por lo que no se descarta la posibilidad de la utilización de estos materiales verdes como soporte de los *Azotobacter* en su uso como «fertilizante bacteriano».

Secciones de Microbiología y Química Agrícola.
Estación Experimental del Zaidín (C. S. I. C.)
Granada.

BIBLIOGRAFÍA

- BAREA, J. M.; OCAMPO, J. A.; AZCON, R.; OLIVARES, J., y MONTOYA, E. (1978). Effects of ecological factors on the establishment of *Azotobacter* in the rhizosphere. Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria. Bull. ecol. Res. Commun. (Stockh), 26, 325-330.

- BROWN, M. E. (1973). Soil bacteriostasis limitation in growth of soil and rhizosphere bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 19, 195-199.
- DAVIS, R. D. (1975). Soil bacteriostasis: inhibition of spore germination and microcolony development in agar disks incubated on nonsterile soil. *Can. J. Microbiol.*, 21, 1270-1272.
- DAVIS, R. D. (1976). Soil bacteriostasis: relation to bacterial nutrition and active soil inhibition. *Soil Biol. Biochem.*, 8, 429-433.
- FORBES, R. S. (1974). Decomposition of Agricultural Crop Debris, 723-742. En C. H. Dickinson and G. J. F. Pugh (Ed.). «Biology of Plant Litter Decomposition». Vol. 2. Academic Press. London and New York.
- GALLARDO-LARA, F.; VITORINO, B.; AZCON, M., y OCAMPO, J. A. (1980). Utilización de un suelo a la adición de diversos «composts» de turba. *Cuad. C. Biol.*, 2.1., 7-13.
- GALLARDO-LARA, F.; VITORINO, B.; AZCON, M., y OCAMPO, J. A. (1980). Utilización de diferentes residuos de leguminosas como abono verde. I. Efecto sobre los nutrientes N, P, S. *An. Edaf. y Agrobiol.*, XXXIX (5-6), 923-934.
- GAUR, A. C.; SADASIVAM, K. V.; VIMAL, O. P., y MATHUR, R. S. (1971). A study on the decomposition of organic matter in an alluvial soil; CO₂ evolution, microbiological and chemical transformations. *Plant and Soil*, 34, 17-28.
- HABAN, A., y PROKOPOVA, A. (1966). Green manuring and its effect on soil microflora. *Ved. Pr. Vysk. Ust. rastl. Vyroby Piestanoch.*, 4, 129-138.
- KEIM, R.; WEBSTER, R. K., y WICK, C. M. (1975). Quantitative effects on incorporating rice residue on populations of soil microflora. *Mycologia*, 57, 280-292.
- LAURA, R. D. (1975). On the stimulating effect of drying a soil and the retarding effect of drying a plant material. *Plant and Soil*, 44, 463-465.
- MISHRA, M. M.; NEELAKANTAN, S.; BHARDWAJ, S. K., y VYAS, S. R. (1973). Quantitative microbiological changes during decomposition of plant material in an alkali soil. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektion Krankheiten und Hygiene II.*, 128, 352-355.
- OCAMPO, J. A. (1976). Investigación de los factores ecológicos que afectan el establecimiento en la rizosfera de microorganismos utilizados como fertilizantes biológicos: *Azotobacter* y fosfobacterias. Tesis Doctoral, Granada, 124.
- OCAMPO, J. A.; BAREA, J. M., y MONTOYA, E. (1978a). Bacteriostasis and the inoculation of phosphate-solubilizing bacteria in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 439-440.
- OCAMPO, J. A.; BAREA, J. M., y MONTOYA, E. (1978b). Amensalism as ecological factor affecting the establishment of *Azotobacter* and phosphobacteria in the rhizosphere. *Polish J. Soil Sci.*, 11.
- POCHON, J., y TARDIEUX, P. (1962). *Techniques d'analyse en microbiologie du sol.* Ed. La Tourelle. Saint Mandé (Seine).
- POKORNA-KOZOVA, J. y NOVAK, B. (1971). Effect of manuring and fertilizing on soil microflora. *Trans. Inter. Symp. Humus et Planta V (Praga)*, 81-85.
- RAMASWAMI, P. P., y RAJ, D. (1973). Effect of green manure and nutrient applications on the change in soil microbial population. *Madras Agricul. J.*, 60, 995-1000.
- ROBERT, J. W., y LOCHHEAD, A. G. (1955). Qualitative studies of soil microorganisms. XIII. Effect of decomposition of various crop plants on the nutritional groups of soil bacteria. *Soil Sci.*, 80, 147-154.
- SCHULZ, F. A. (1968). Investigations on the effect of green manuring on eyespot disease in wheat and on *Cercospora herpotrichoides* From. I. Effect on development stages on the fungus in soil. *Phytopath. Z.*, 62, 1-20.

- SELCUK, M., y GROSSMANN, F. (1967). Einfluss der grundungung auf das auftreten der Fusarium-welke a baumwolle in gefassversuchen. Plant and Soil, 26, 413-431.
- SINGH, R. S., y PANDEY, K. R. (1966). Effect of green and mature plant residues and compost on population of *Pythium aphanidermatum* in soil. Indian Phytopathol., 19, 367-372.
- STRZELCZYK, E., y SITEK, J. M. (1972). The effect of organic enrichment on generic composition and on the incidence of nutritional groups in soil bacteria, Polish J. Soil Sci. 5, 69-76.

Recibido para publicación: 12-VII-79

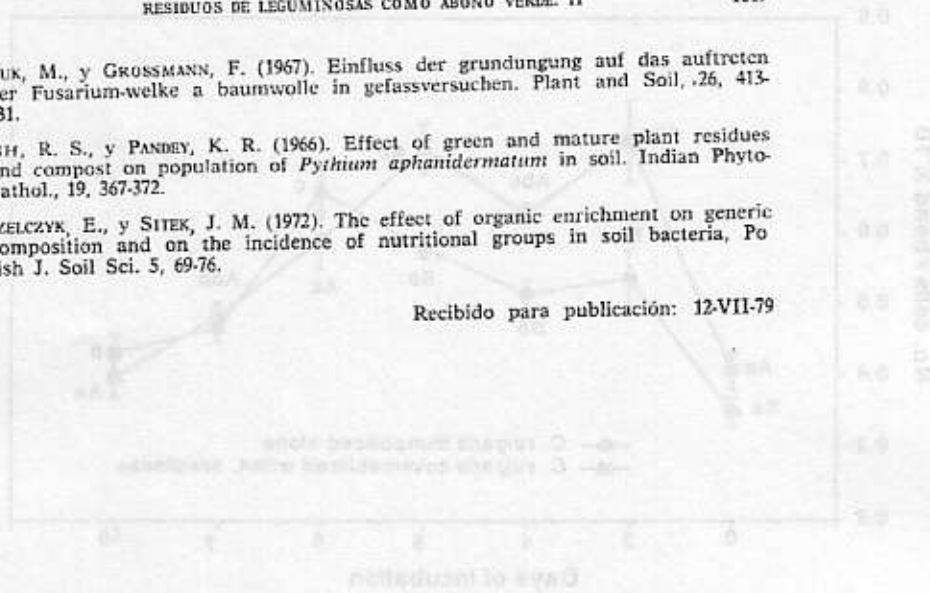


Figure 3. First experiment of growth of *C. vulgaris* immobilized alone and co-immobilized with *A. brasilense* Cd in batch cultures. Points on each curve denoted by a different lower case letter differ significantly at $P < 0.05$ in one-way ANOVA. Points denoted by a different capital letter at each time of incubation differ significantly at $P < 0.05$ in Student's *t* test. Bars represent the standard error (SE). Absence of SE indicates that the SE is smaller than the point.