

Evaluación cualitativa y cuantitativa de microalgas en la rizosfera del cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L) Walp).¹

Qualitative and quantitative evaluation of microalgae in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) rhizosphere.

Katiuska Acosta²
Rixio Santos²
Soraya Silva³
Douglas Esparza⁴

Resumen

Se efectuaron aislamientos de microalgas de suelos ubicados en la granja "Ana María Campos" de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, bajo las siguientes condiciones: sin siembra de frijol por ser un suelo virgen para el cultivo (A), siembra de frijol por vez primera (B) y siembra continua de frijol (C), para los cuales se hicieron muestreos tres semanas después de la siembra (1) y tres semanas antes de la cosecha (2), y suelo donde se dejó de sembrar frijol (D), con el fin de estudiar la fluctuación poblacional de microalgas en la rizosfera. Las cuentas totales de microalgas/gramo de suelo efectuadas a las 48 horas de su aislamiento en solución CHU-NO, mediante la técnica de platos de suelo fueron los siguientes: suelo A: 849.180; B1: 575.440; B2: 677.642; C1: 1.566.751; C2: 1.522.051 y D: 1.435.489.40. Las microalgas aisladas por la técnica de los platos de dilución corresponden a los géneros de *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Nodularia* y la división Bacillariophyta. Los datos de las poblaciones de microalgas fueron analizados estadísticamente bajo el modelo de parcelas divididas en el tiempo, completamente aleatorizado, cuyo resultado muestra que existe diferencias altamente significativas en las poblaciones de microalgas presentes en la rizosfera según el estado de desarrollo del cultivo frijol y el tiempo de permanencia de éste en el suelo.

Palabras claves: frijol, *Vigna unguiculata*, suelo, rizosfera, microalgas.

Recibido el 27-7-94 • Aceptado el 27-4-95

1. Proyecto No. 1211-93. Financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES).

2. UTF-IIA. Facultad de Agronomía. Apartado 15205. LUZ.

3. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. LUZ.

4. Dpto. de Estadística. Facultad de Agronomía. LUZ.

Abstract

Microalgae isolation were made from soil located in the farm "Ana María Campos" of the Agronomy Faculty, Zulia University, under the following conditions: without cowpea sowing for being a virgin soil to this crop (A); sowing of cowpea by the first time (B) and continuous sowing of cowpea (C), taking samples three weeks after sowing (1) and three weeks before harvesting (2), and soil where cowpea was not sowed any more (D), to study the population fluctuation of microalgae in the rhizosphere. The total counts of microalgae per gr of soil made at 48 hours of incubation in CHU-NO solution were as follows: A: 849.188; B1: 575.440; B2: 677.642; C1: 1.566.751; C2: 1.522.051 and D: 1.435.489. The microalgae isolated by the dilution plate technique belong to the genera *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Nodularia* and the Bacyllaciophyta Division. The data of the microalgae population were analyzed by means of a split plot in the time, completely aleatorized model who showed differences highly significatives between the populations according to the growth state of the cowpea crop and the time of permanence of it in the soil.

Key words: Cowpea, *Vigna unguiculata*, soil, rhizosphere, microalgae.

Introducción

Las algas constituyen un grupo muy diverso de organismos, variando en tamaño, desde células individuales tan pequeñas como un micrómetro hasta las grandes algas marinas que crecen más de 50 metros (3, 12).

Las mayorías de las algas son acuáticas, viven en aguas dulces o marinas y es posible encontrar algunas algas en habitats muy diversos como troncos, desiertos, aguas termales. En el suelo son virtualmente ubicuas sobre o cerca de la superficie (3, 5, 12). Las algas verdes unicelulares, verde azul y las diatomeas son las formas que se encuentran con mayor frecuencia ubicándose en cantidades que oscilan entre 10.000 a 10.000.000 de unidades que forman colonias por gramo de suelo, registrándose cifras mayores en la superficie o a unos cuantos centímetros de

ésta, encontrándose grandes números de células vivas a mayor profundidad del suelo, hasta un metro o más en algunos casos (5, 9).

Una de las principales funciones de las algas en el habitat terrestre es el resultado de su nutrición fotoautotrófica. Esta función es la generación de materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas. Las algas que viven en la superficie del suelo convierten el CO₂ en materiales carbonados, consecuentemente, la microflora fotosintética en algunos habitats es la responsable de incrementar la cantidad de carbono orgánico (9). La magnitud de estas adiciones en el suelo de cultivos no se ha estimado con precisión, pero el papel de las algas de suministrar carbono orgánico, al colonizar áreas desnudas, estériles o erosionadas,

está por encima de cualquier discusión. Además, tienen la capacidad de intemperizar las rocas, ya que capas delgadas de algas recubren rocas y la materia orgánica de estas células al morir propicia el crecimiento de bacterias y hongos que se constituyen en colonizadores secundarios.

Se sabe también de las interacciones simbióticas de algas y hongos (liqueses) que liberan compuestos que llevan a cabo la intemperización. Las algas son notables también debido a su contribución con la estructura del suelo y el control de la erosión. Otro aspecto resaltante de las microalgas es su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en ambientes carentes del elemento; variando la cantidad fijada de acuerdo a la especie de microalga presente. Según diversos estudios, el contenido de nitrógeno del suelo aumenta con la inoculación de estos con cepas de microalgas. Esto ha arrojado resultados que han puesto de manifiesto que las algas fijan cantidades alrededor de 22.5 kilogramos de nitrógeno por hectárea, mientras que las plantas absorben 4.8 kilogramos del elemento (1, 2, 4, 7).

Las algas verde azul son especialmente numerosas en arrozales, fijando cantidades apreciables de ni-

trógeno. Este nivel de fijación aumenta cuando la planta tiene su máximo desarrollo (2, 4), y este estímulo es debido aparentemente al CO₂, que alcanza un alto nivel cuando las plantas de arroz crecen vigorosamente. Otros autores señalan la importancia de las algas en el rescate de las praderas, gracias a que ellas son capaces de remover determinados elementos a base de hierro del terreno y absorber algunas sustancias tóxicas de los terrenos, por lo que las algas resultan ser decisivas en la composición química del suelo y su productividad. Se ha señalado 15 especies de microalgas verde-azul fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género *Nostoc*, así como dos especies de *Galotrix*. De igual manera, se reporta que a temperaturas altas o condiciones tropicales, la fijación de nitrógeno por las algas contribuye de forma notable en el enriquecimiento del nitrógeno del suelo.

Todo ello sugiere que el estudio de las poblaciones de microalgas interactuantes en la rizosfera del cultivo frijol, puede brindar una alternativa para resolver problemas de productividad y aprovechamiento industrial (11).

Materiales y métodos

Recolección de las muestras de suelos.

Las muestras de suelos se tomaron de la granja "Ana María Campos" perteneciente a la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia, ubicada en la Planicie de

Maracaibo, Estado Zulia, bajo las siguientes condiciones:

Suelo A: Suelo virgen que nunca ha sido sembrado con frijol.

Suelo B: Suelo en el que se ha establecido la siembra de frijol por primera vez.

Suelo C: Suelo que ha sido sembrado con frijol por un período mínimo de tres temporadas continuas.

Suelo D: Suelo donde se ha dejado de sembrar frijol por lo menos durante 6 meses.

En los suelos que correspondieron a las condiciones A y D se tomaron 6 muestras de suelo a una profundidad de 15 cm; mientras que los que cumplieron con la condición B y C, se les tomaron 12 muestras a cada uno, las cuales fueron discriminadas de la siguiente forma:

6 muestras a las 3 semanas después de la siembra.

6 muestras a las 3 semanas antes de la cosecha, bajo la misma condición de profundidad que para los suelos A y D.

Posteriormente, las muestras fueron trasladadas a la Unidad Técnica Fitosanitaria de la Facultad de Agronomía, de La Universidad del Zulia, para su posterior procesamiento.

Aislamiento de microalgas.

Aislamiento de la rizosfera.

El aislamiento de las microalgas de la rizosfera del cultivo frijol se realizó mediante la técnica de los platos de dilución y platos de suelo:

a) Platos de Dilución:

Se tomaron 25 g de suelo para preparar diluciones (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) de suelo, transfiriendo 1 ml de cada dilución a frascos contentivos de 50 ml de la solución CHU-NO (8, 14).

Estos frascos fueron incubados a una temperatura alrededor de 26°C , durante un período de 1-2 se-

manas bajo condiciones de luz natural.

b) Platos de suelo:

Se tomó 1 g de suelo y se colocó en frascos conteniendo 50 ml de solución CHU-NO, incubándose durante un período de 24-48 horas, bajo condiciones de luz natural (8, 14).

Contaje de Microalgas:

Luego del período de incubación se procedió a realizar el contaje de las microalgas desarrolladas. El mismo se hizo mediante el contaje directo al microscopio con la ayuda de la cámara de Neubauer (13, 14).

Purificación de Microalgas:

De los frascos de dilución se procedió a tomar ansadas del medio líquido y realizar un estriado en forma radial sobre la superficie del medio Agar CHU-NO (CHU-NO + 15 g de agar), de manera de lograr la separación de las diferentes colonias de microalgas. Estas placas fueron incubadas durante un período de 3-7 días a una temperatura alrededor de 26°C , bajo la condición de 24 horas de luz continua.

Una vez obtenidas las colonias de microalgas bien desarrolladas y aisladas, se tomaron muestras de cada una de ellas y se colocaron nuevamente en frascos con 50 ml de solución CHU-NO. Este medio se renovó cada tres semanas, manteniendo puros los cultivos, para su posterior identificación.

Diseño Estadístico:

Las poblaciones de microalgas por gramo de suelo en la rizosfera, para la condición de suelo y edad de la planta, fueron evaluadas mediante un

arreglo de parcelas divididas en el tiempo en un diseño experimental completamente aleatorizado, con seis repeticiones y la unidad experimental representada por cada una de las muestras de suelo tomadas.

Identificación:

De cada una de las colonias de microalgas purificadas y desarrolladas en medio agar CHU-NO, se hicieron observaciones de sus características microscópicas, realizando montajes de las mismas en las láminas portaobjetos con una gota de glicerina (15, 16).

Resultados y discusión

De los aislamientos realizados en la rizosfera se pudieron observar una gran variedad de colonias de microalgas diferenciándose éstas por la gama de tonalidades verdosas que se observaron en el medio inoculado. Estas variaban desde colonias verde amarillento a verde-azul. La coloración del medio CHU-NO transparente comenzaba a cambiar a verde después de los 5-7 días de incubación para los platos más concentrados, ya que, para los frascos correspondientes a las últimas diluciones, este cambio se apreciaba alrededor de los 10-14 días, y en los mismos, la variabilidad de los colores verdosos era menor y se veía la predominancia de una sola tonalidad. De igual manera, el grado de frecuencia con que se presentaban las diferentes microalgas en cada frasco variaba de acuerdo a la dilución, por lo que se observaba dominancia y abundancia de éstas de acuerdo a la muestra estudiada.

Otra característica observada en cuanto al desarrollo fue la forma de crecimiento, ya que muchas colonias se presentaban adheridas a las paredes del frasco mientras que

otras crecían tanto en el fondo como en la superficie del medio líquido.

Cuantificación:

Las poblaciones de microalgas se presentan en el Cuadro 1. De acuerdo al análisis de la variación para las poblaciones de microalgas por condición de suelo, se pudo apreciar que existen diferencias altamente significativas entre los valores del número de microalgas desarrolladas, por lo que las poblaciones de microalgas se ven influenciadas por la presencia y ausencia del cultivo de frijol en el suelo.

En la comparación de medias presentadas en el Cuadro 1, se puede apreciar que existen dos grupos de medias, en los cuales las condiciones C1, D, A, B2 y B1 se ubican dentro del grupo a, no observándose diferencias significativas entre las poblaciones de microalgas desarrolladas en estas condiciones de suelo. Los valores medios del número de microalgas obtenidas en la condición C2, se diferencian del resto obteniéndose los valores de poblaciones más bajos con 152.054.75 microalgas/g mientras que la condición C1, fue la

Cuadro 1. Valores medios de las poblaciones de microalgas por condición de suelo.

Condición de Suelo	Valor Medio	Grupo
C ₁	1.566.751,10	A
D	1.435.489,40	A
A	849.180,48	A
B ₂	677.641,51	A
B ₁	575.439,94	A
C ₂	152.054,75	B

Tukey al 5%. Medias con letras iguales no difieren significativamente.

Cuadro 2. Valores medios para las poblaciones de microalgas para el estado de desarrollo del cultivo de frijol.

Estado de Desarrollo	Valor Medio	Grupo
1	948.418,46	A
2	311.888,96	B

Tuckey al 5%. Medias con letras iguales no difieren significativamente.

que presentó los máximos valores de poblaciones con 1.566.751,10 microalgas/g.

En el Cuadro 2 se presenta la comparación de medias de las poblaciones de microalgas de acuerdo al estado de desarrollo de la planta. Como puede apreciarse, los mayores valores corresponden a aquellas plantaciones con 21 días de desarrollo, con un valor promedio de 948.418,46 microalgas/g de suelo, y aquellas plantaciones con un tiempo de desarrollo alrededor de 2 meses, alcanzaron poblaciones de 311.888,96 microalgas/g de suelo.

Sin embargo, este comportamiento varía de acuerdo al tiempo de permanencia que tenga el frijol en el suelo como se puede apreciar en el

Cuadro 3, en la cual se muestran 3 grupos de medias obtenidas para el análisis de la interacción condición de suelo y estado de desarrollo (CD x ED). La condición de suelo C1, en el grupo, la condición B1 y B2 en el grupo b, no encontrándose diferencias significativas entre estos valores y por último, el grupo C, integrado por la condición C2.

A medida que el suelo es sembrando continuamente, se observa en plantas adultas una disminución significativa en el número de microalgas, existiendo una relación inversa, ya que a mayor edad de la planta menor será la población de microalgas presente en la rizosfera (Figura. 1).

Cuadro 3. Prueba de media para la interacción condición de suelo y Estado de Desarrollo

Estado de desarrollo	Sembrado primera vez	Sembrado Continuamente
3 semanas después de la cosecha.	575.440 ^b	1.566.751 ^a
3 semanas antes de la cosecha.	677.642 ^b	152.055 ^c

Tuckey al 5%. Medias con igual letra no difieren significativamente.

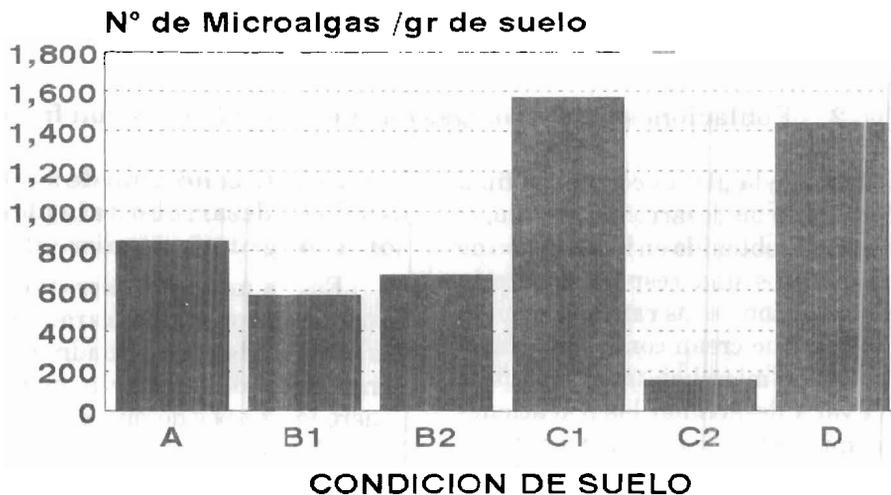


Fig. 1 Poblaciones de microalgas por condición de suelo

Efecto contrario es observado en aquellos suelos donde se establece por vez primera la siembra de frijol, ya que las poblaciones se vieron estimuladas; reflejando un mayor nivel poblacional cuando las plantas de frijol tenían un estado de desarrollo más avanzado (Figura 2), aunque

éste aumento no fue diferentemente significativo.

Parece ser que las poblaciones de microalgas de la zona de la rizosfera responden ante los exudados, secreciones y composición de los tejidos jóvenes de las plantas, más que a los productos resultantes del meta-

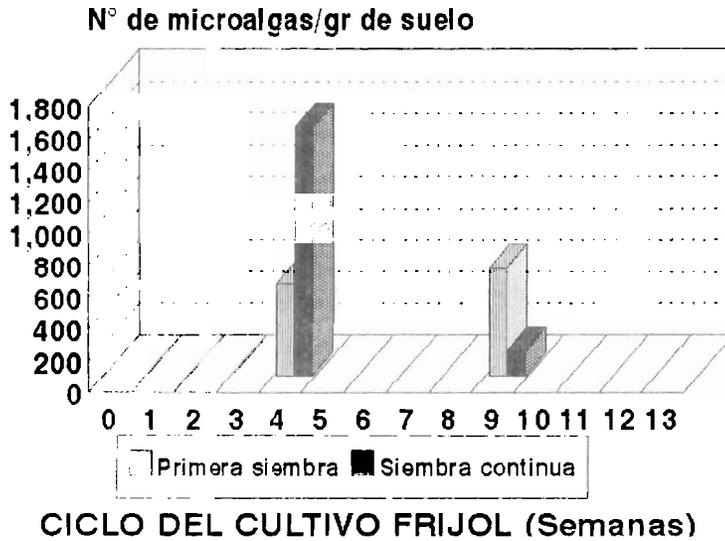


Fig. 2 Poblaciones de microalgas en suelos sembrados con frijol

bolismo de la planta cercano al final de su ciclo de desarrollo. Por ello, el resultado obtenido en la condición de suelo B, es una respuesta ante la estimulación de las raíces nuevas en el suelo que crean condiciones favorables: un microhabitat que permite activar y desarrollar las poblaciones de microalgas presentes en bajas densidades y romper el estado de latencia o quistes que tienden a formar bajo condiciones desfavorables, y una vez adaptadas y estimuladas por las nuevas condiciones, comienzan a responder ante estos exudados y tejidos muertos de la planta que pueden ser reutilizados como fuente de energía y carbono, haciendo que se pueda apreciar un aumento de la población al final del ciclo de la planta.

Efecto de la condición de suelo y estado de desarrollo de la planta sobre los grupos de microalgas.

En los montajes microscópicos se pudieron apreciar las características presentadas en el Cuadro 4, que permitieron diferenciar a nivel de género los grupos de microalgas aisladas (Figuras 3 y 4).

Desde el punto de vista cualitativo se aprecia (Cuadro 5) que el mayor porcentaje de microalgas presentes en el suelo pertenecen al grupo de las *Cianophytas* o algas verdeazul, siendo los géneros más representativos *Anabaena* y *Oscillatoria*, las cuales permanecen constantes en el suelo, sin verse influenciadas por la presencia o ausencia del frijol en el mismo y la edad de la planta; y otros géneros como *Nostoc*, *Spirulina*, *Nodularia* son de comportamien-

Cuadro 4. Características de los géneros de microalgas aisladas de la rizosfera del cultivo del frijol.

Géneros	Características
<i>Anabaena</i>	- Presencia de tricomas simples, sueltos, rectos, sinuosos
<i>Nostoc</i>	- Presencia de Heterocistos y Acinetas.
<i>Oscillatoria</i>	- Talos gelatinosos, tricomas entreverados. - Heterocistos intercalares. - Tricoma recto la mayor parte de su longitud, pero marcadamente combados, algo afinado en sus extremos apical, redondeados.
<i>Nodularia</i>	- Tricoma uniseriado, no ramificados con vainas - Células en discos o comprimidos. - Heterocistos intercalares.
<i>Spirulina</i>	- Tricoma unicelular, espiralados sin septas, casi del mismo diámetro y ancho.
<i>Diatomeas</i>	- Diatomea Pennada no identificada.

Cuadro 5. Géneros de microalgas aisladas de la rizosfera del cultivo de frijol por condición de suelo y estdo de desarrollo.

Condición de Suelo	Estado de Desarrollo	Géneros
A	--	<i>Anabaena, Oscillatoria</i>
B	1	<i>Anabaena, Oscillatoria Nodularia.</i>
B	2	<i>Anabaena, Oscillatoria Spirulina, Nostoc, Diatomeas.</i>
C	1	<i>Anabaena, Nostoc, Nodularia, Oscillatoria.</i>
C	2	<i>Anabaena, Oscillatoria Nodularia, Spirulina, Nostoc.</i>
D	--	<i>Anabaena, Oscillatoria Spirulina.</i>

to selectivos de acuerdo a la condición de suelo y edad de la planta, controlando la madurez de la planta, el efecto de la rizosfera y el grado de respuesta por grupo de microalgas específicos.

De igual forma se presentaron poblaciones de microalgas pertenecientes a las *Bacillariophytas* o *Diatomeas*, del grupo de las Pennadas, quienes están presentes en el suelo en menor frecuencia, pudiendo ser, ya que estos son más susceptibles a

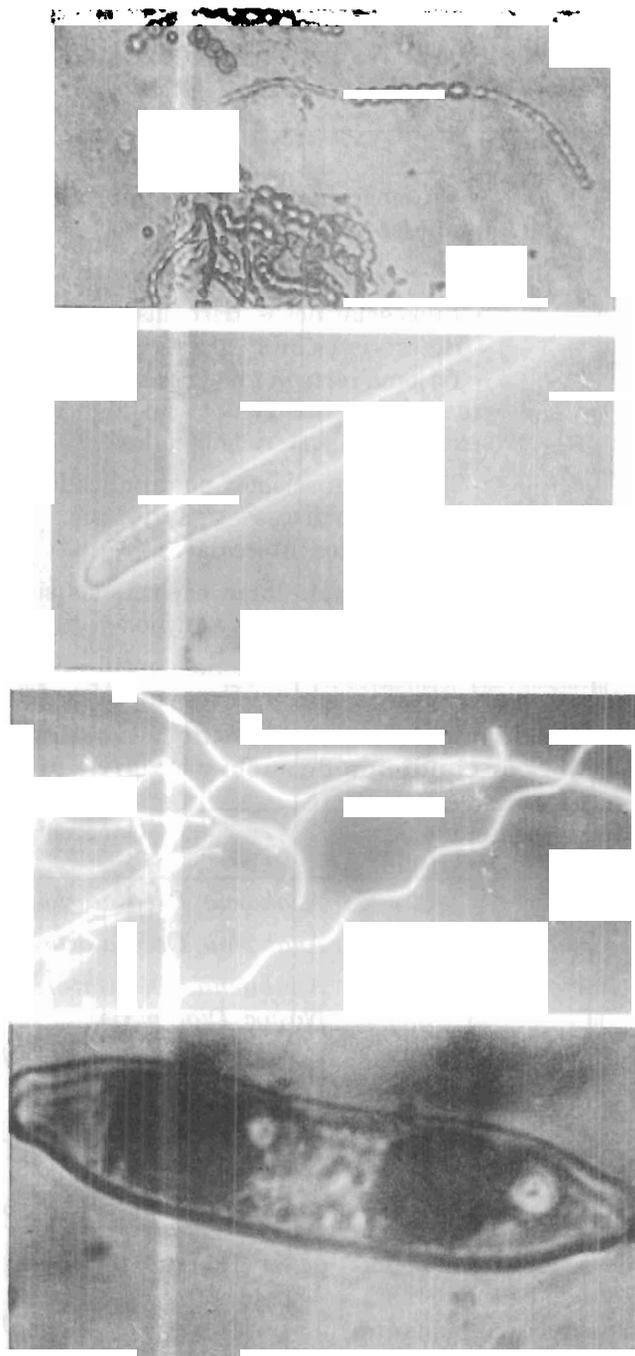
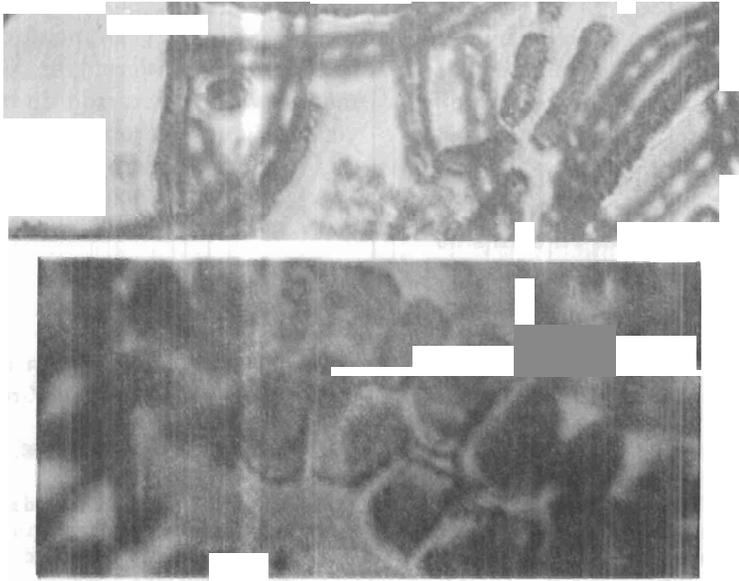


Fig. 3. Microalgas aisladas de la Rizosfera del cultivo frijol
A: Anabaena B: Oscillatoria
C: Spirulina D: Diatomea



**Fig. 4. Microalgas aisladas de la rizosfera del cultivo del frijol:
A: Nostoc; B: Nodularia**

las condiciones de desecación, a diferencia de las *Cyanophytas* que son más resistentes y pueden permanecer en el suelo en estado de latencia

por varios años; además de su mayor afinidad a pH alcalino presente en el suelo, que las diferencias de las primeras.

Conclusiones

- Las poblaciones de microalgas están influenciadas por la ausencia o presencia del cultivo frijol en el suelo.

- Las poblaciones de microalgas están influenciadas por la edad de la planta, dependiendo del tiempo de permanencia del cultivo en el suelo.

- El número de microalgas tiende a incrementar con la edad de la planta, en suelos donde se establece por vez primera el cultivo.

- En suelos sembrados continuamente las poblaciones de microalgas disminuyen a medida que la planta envejece.

- Los grupos de microalgas dominantes en el suelo corresponden a las *Cyanophytas* o algas verde azul, representados en su mayor parte por los géneros *Anabaena* y *Oscillatoria* y en menor grado por *Nostoc*, *Nodularia* y *Spirulina*.

- El grupo de las *Bacillariophytas* o Diatomeas son de presencia ocasional en los suelos estudiados.

Recomendaciones

- Analizar las poblaciones de microalgas presentes en suelos donde se cultivan otros rubros agrícolas.

- Estudiar el efecto de las propiedades físico-químicas del suelo sobre las poblaciones y grupos de microalgas presentes en el mismo.

- Evaluar el potencial biofertilizador de las microalgas aisladas, mediante la realización de bioensayos en los que se compare la capacidad fijadora de nitrógeno.

Literatura citada

1. Boussiba, S. 1991. Nitrogen Fixing Cyanobacteria. Potencial Uses. Plant and Soil. 137:117-180.
2. Bravo, C. 1988. Fijación de Nitrógeno por algas **Cyanophytas** (verdes azuladas libres). Instituto de Investigaciones Científicas. Centro de Ecología y Ciencias Ambientales. Seminario Tesis. 48 p.
3. Danlet, W. 1987. Biología de las algas. Limusa, México. pp. 189, 225-230.
4. Espinosa, S; Palacios y Ortega, M. 1984. Fijación de Nitrógeno por cepas de *Nostoc comune Vaucher*, aisladas de suelo del Estado de Morelos México, comparadas con dos cepas de *Anabaena* Rew. latmer. Microbiology 26:323-330.
5. Garassini, L. 1967. Microbiología Agraria. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. pp. 334-336.
6. Gupta, A.B. and Shukla, A. C. 1967. Studies on the nature of algae Growth Promoting Sustances and Their influence on Growth, yield and protein contents of rice plants. Labdem J. Tech. 5:162-163.
7. Handi, Y. A. 1985. La fijación de nitrógeno en la explotación de los Suelos. Departamento de Microbiología. Instituto de Estudio de Suelo y Agua. Centro de Investigación Agrícola y Servicio de Recursos, Manejo y Construcción de suelo. (FAO). pp. 48-73, 93-102, 127.
8. Kimar, H. D. 1975. Textbook of Algae. Mc Millam Tropical Biological Some. pp. 178-202.
9. Martin, A. 1980. Microbiología del suelo. Editorial, S. A. México Distrito Federal. pp 85-101.
10. Megharafm, K., Venka and A.S. Rao. 1989. Theuse of unicellular Soil Green Algae Furinsee Tacide Bioassay. Journal of Microbiological Methodology. 10. 110-122.
11. Miliani, M. 1984. Potencial de Algas de aguas dulces con fines agroindustriales. Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado". Escuela de Agronomía. pp. 43.
12. Sabeda, D. 1990. Enviromental Biotechnology. Isolation of Biotechnology organisms from nature. Mc Gram-Hill. Publishing Company. pp. 81-115.
13. Sournia, A. 1978. Phytoplankton Manual. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization Monographs on Oceanographic Methodology. pp. 182-189.
14. Stein, J. 1975. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and growth measurements. Cambridge. University Press. London. 446 p.
15. Yacubson, S. 1969. Algas de ambientes acuáticos continentales nuevas para Venezuela. Boletín No. 3 del Centro de Investigaciones Biológicas. Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia. Maracaibo. pp. 87.
16. Yacubson, S. 1972. Catálogoe Inografía de la Cyanophytas de Venezuela. Centro de Investigaciones Biológicas. Facultad de Humanidades y Educación. Univer-sidad del Zulia. Maracaibo. pp. 133.