

## Evaluación de composta con presencia de metales pesados sobre el crecimiento de *Azospirillum Brasilense* y *Glomus Intraradices* inoculados en *Zea Mays*

VÁZQUEZ-JACINTO, Jenny M.\*†, ROJAS-APARICIO, Augusto, ROMERO-RAMÍREZ, Yanet, ROMERO-GOMEZCAÑA, Nelly R.

*Laboratorio de Investigación de Biotecnología y Genética Microbiana (LIBGM), UACQB-UAGro.*

*Secretaría de Desarrollo Rural (SEDER). Av. Lázaro Cárdenas, S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo Guerrero. 01(747)4725503*

Recibido Julio 8, 2013; Aceptado Enero 15, 2014

### Resumen

La composta es el material orgánico que se obtiene como producto de la acción microbiana controlada sobre residuos orgánicos. En la actualidad, la biotecnología verde se ha encargado de integrar el uso de biofertilizantes y composta, los cuales representan una importante alternativa en la reducción del uso de fertilizantes químicos. Para tratar de reducir el impacto de los fertilizantes, el Gobierno del estado de Guerrero, a través de la Secretaría de Desarrollo Rural (SEDER), ha promovido el uso de biofertilizantes (*A. brasilense* y *G. intraradices*), así, como la introducción de composta para el mejoramiento del cultivo, sin embargo, es necesario evaluar el desempeño de la composta antes de distribuirla, pues en ella se ha detectado la presencia de metales pesados, los cuales se encuentran dentro de los límites permisibles.

**Composta, Metales pesados, *Azospirillum Brasilense*, *Glomus Intraradices*, *Zea Mays*.**

### Abstract

Compost is organic material obtained as a result of the controlled microbial action on organic waste. Today, green biotechnology has been commissioned to integrate the use of bio-fertilizers and compost, which represent an important alternative in reducing the use of chemical fertilizers. To try to reduce the impact of fertilizers, Guerrero State Government, through the Ministry of Rural Development (seder), has promoted the use of biofertilizers (*brasilense A.* and *G. intraradices*) as well as the introduction of compost for crop improvement, however, it is necessary to evaluate the performance of the compost before distribution, because it has detected the presence of heavy metals, which are within the permissible limits.

**Compost, heavy metals, *Azospirillum Brasilense*, *Glomus intraradices*, *Zea Mays*.**

**Citación** VÁZQUEZ-JACINTO, Jenny M., ROJAS-APARICIO, Augusto, ROMERO-RAMÍREZ, Yanet, ROMERO-GOMEZCAÑA, Nelly R. Evaluación de composta con presencia de metales pesados sobre el crecimiento de *Azospirillum Brasilense* y *Glomus Intraradices* inoculados en *Zea Mays*. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 – Abril 2014, 1-1: 406-412

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: jen\_1512@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

## Introducción

La composta es el material orgánico que se obtiene como producto de la acción microbiana controlada sobre residuos orgánicos. En la actualidad, la biotecnología verde se ha encargado de integrar el uso de biofertilizantes y composta, los cuales representan una importante alternativa en la reducción del uso de fertilizantes químicos. Para tratar de reducir el impacto de los fertilizantes, el Gobierno del estado de Guerrero, a través de la Secretaria de Desarrollo Rural (SEDER), ha promovido el uso de biofertilizantes (*A. brasilense* y *G. intraradices*), así, como la introducción de composta para el mejoramiento del cultivo, sin embargo, es necesario evaluar el desempeño de la composta antes de distribuirla, pues en ella se ha detectado la presencia de metales pesados, los cuales se encuentran dentro de los límites permisibles.

## Objetivos

- Evaluar el efecto de los metales pesados presentes en la composta sobre el desarrollo de *A. brasilense* y *G. intraradices* inoculados en semillas de *Zea mays*.
- Determinar las propiedades físico-químicas del suelo y la composta, además de conocer la microbiología de esta última.
- Evaluar el desarrollo de la planta de maíz.
- Determinar el crecimiento de *A. brasilense* a partir de raíz y la colonización micorrízica de *G. intraradices* en *Zea mays*.

## Metodología

### Material vegetal

Para la esterilización de las semillas, se dejaron en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril durante 15 min, 1 min en 1 mL de etanol al 70 %, 1 min en 1 mL de cloralex al 50% y finalmente se lavaron de 5 a 7 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril. Asimismo, la composta se esterilizó en autoclave a 121 °C por 1 hr, con la finalidad de eliminar la población micorrízica nativa.

### Material biológico

Las semillas se impregnaron con un adherente no tóxico a base de carboximetil celulosa. Después se mezcló una dosis *G. intraradices* (333 grs) y *A. brasilense* (117 grs), para finalmente aplicarlos sobre las semillas.

### Experimento en campo

El cultivo se estableció en una maceta de polietileno negro de alta densidad con capacidad para 3 kg, esta se perforó de la parte inferior para favorecer el drenaje de agua y se le colocó una mezcla de  $\frac{3}{4}$  suelo más  $\frac{1}{4}$  de composta. Se sembraron 5 semillas en cada maceta para lograr la germinación por lo menos de dos plantas. A los 30 días se realizó el trasplante, dejando las plantas más competentes, del resto se estudió su longitud y volumen radical. Las plantas se revisaron durante 8 ciclos consecutivos, con duración de 15 días cada ciclo. El riego se realizó con agua corriente cada 24 hrs, de acuerdo al requerimiento hídrico de la planta. Cada 72 hrs se tomó la temperatura máxima y mínima, además de tener un registro de los días lluviosos. Cada tratamiento (ver tabla 1), contó con 5 repeticiones y sus respectivos controles.

Tratamiento	Suelo	Composta	Semilla	Biofertilizante
CN	+	-	+	-
T1	+	+	+	-
T2	+	+ estéril	+	-
T3	+	+	+	+
T4	+	+ estéril	+	+
T5	+	+	+ estéril	+
T6	+ estéril	+ estéril	+ estéril	+

**Tabla 1** Lista de tratamientos que se utilizarán en el proyecto

### Determinación de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo y la composta

El suelo utilizado se tomó del terreno de la Fundación Produce de Guerrero, donde se estableció el experimento. Aquí se analizaron las siguientes propiedades: pH, humedad, materia orgánica, composición del suelo (arcilla, limo y arena) y porcentaje de C/N. De igual manera se caracterizó la composta, tomando además de estos parámetros, la existencia de microorganismos patógenos para el humano.

### Determinación de metales pesados en la composta

Este paso se realizó en el Laboratorio de Geoquímica, perteneciente a la Unidad Académica Ciencias de la Tierra, ubicado en Taxco el Viejo, Guerrero. Los metales se analizaron por ICP-AES.

### Aislamiento de *A. brasilense* a partir de rizosfera y observación de colonización micorrízica por *G. intraradices* en plantas de maíz

De la rizosfera se tomó 1 g de sustrato. Este se colocó en 9 ml de solución salina al 0.98% para la dilución 1:10, hasta conseguir la dilución 1:100 000.

De la dilución 1:100, 1:10 000 y 1:100 000 se sembraron en cada uno de sus respectivos medios de cultivo, medio para la fijación biológica de Nitrogeno (Nfb) para *Azospirillum*, así mismo, para obtener cultivos puros de esta bacteria, se utilizó la técnica de Carreño *et al.*, 2010. Mientras que para la colonización micorrízica se utilizó la técnica de Phillips y Haymann, 1970 y de Gerdemann y Nicholson, 1963. De la bacteria se determinaron las UFC/g de suelo y del hongo el crecimiento de hifas y vesículas (raíz) y conteo de esporas (suelo). Finalmente se realizó una tinción de Gram para la bacteria.

### Variables de estudio

Cada 15 días se tomaron las variables (a partir del brote de la planta hasta su cosecha), estas fueron: diámetro del tallo (este se midió con un vernier), altura de la planta (se midió con un flexómetro) y número de las hojas (se hizo conteo directo). Al finalizar el octavo ciclo se midió la altura de la mazorca, y se realizó la cosecha de la planta. Posteriormente se extrajo la raíz con cuidado y se tomó el volumen de la misma.

### Resultados

A lo largo del experimento se realizaron 8 muestreos cada 15 días (aproximadamente), con la toma de las variables de estudio (DT, AP y NH), el análisis de los resultados se hizo para los 3 genotipos. Otro de los objetivos de este trabajo fue determinar las características físico-químicas del suelo y la composta (ver tabla 2); a esta última se le realizó también un análisis microbiológico, reportando el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeuruginosa* (ver tabla 3).

Determinación	*SUELO		**COMPOSTA
	Resultados	Interpretación	Resultados
pH	7.65	Ligeramente alcalino	7.31
Humedad	1.84%	-	4.08 %
Materia orgánica	2.88%	Media	27.36 %
Nitrógeno	763.86 mg/kg	Muy alta	5963.40 mg/kg
Fósforo	34.89 mg/kg	Muy alta	16.55 mg/kg
Potasio	100.46 mg/kg	Optima	671.70 mg/kg
Calcio	7362.93 mg/kg	Muy alta	6094.33 mg/kg
Magnesio	1494.9 mg/kg	Muy alta	2248.91 mg/kg
Zinc	3.895 mg/kg	-	95.8 mg/kg
Hierro	14.17 mg/kg	Muy alta	103.83 mg/kg
Manganeso	10.07 mg/kg	Muy alta	20.77 mg/kg
C.E.	0.488 dS/m	Muy baja	15.580 dS/m
Textura	Arcillosa	Arcillosa	Franco arenosa
Densidad real	2.18 g/cm <sup>3</sup>	Alta	1.92 g/cm <sup>3</sup>

\*Valores de referencia de la NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. \*\*No existe una norma que establezca los valores óptimos de algunos elementos Conductividad eléctrica = CE.

**Tabla 2** Análisis físico-químico realizado al suelo y composta

Medio de cultivo	UFC/g Composta				Resultado
	No. Colonias	Dilución	UFC/ g		
Sal y manitol	5	1:100	500	<i>S. aureus</i>	NS
MacConkey	16	1:100	116,000	<i>P. aeruginosa</i>	NS
	0	1:100	0	<i>E. coli</i>	Negativo
Salmonella-Shigella	0	1:100	0	<i>Salmonella sp.</i>	Negativo
	0	1:100	0	<i>Shigella sp.</i>	Negativo

No significativo = NS. Unidades Formadoras de Colonia = UFC.

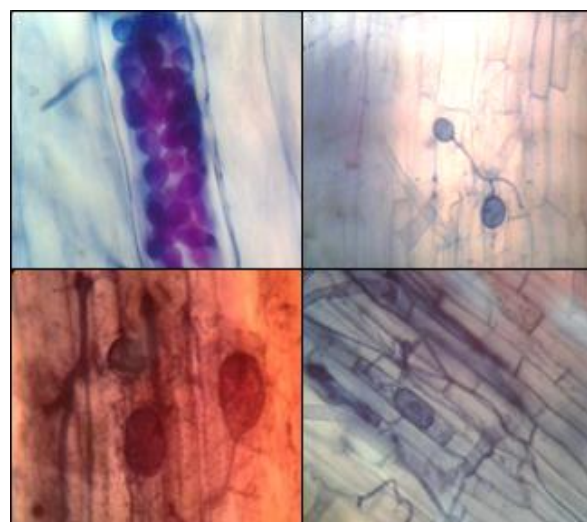
**Tabla 3** Análisis microbiológico para la búsqueda de bacterias patógenas para el humano en composta

Para la determinación de los metales pesados en la composta, los resultados obtenidos fueron comparados con la NT 5167 y la Norma 503 EPA, los cuales no rebasan los límites máximos permisibles (ver tabla 5).

Metales pesados	Composta (mg/kg)	Límites máximos permitidos en composta	
		Norma 503 EPA* (mg/kg)	NTC 5167, 2004** (mg/kg)
As	0.4375	54	41
Cd	0.500	18	39
Cr	23.4375	1200	1200
Cu	91.1875	1200	450
Ni	24.6875	180	420
Pb	62.375	300	300

Valores de la Norma 503 de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA). \*\*Valores de la NTC 5167, 2004, que establece los requisitos que debe cumplir los productos orgánicos usados como abono o fertilizantes y enmiendas de suelo.

**Tabla 4** Concentración de metales pesados en composta



Diversidad morfológica de vesículas y esporas de hongos formadores de micorrizas arbusculares en muestras radicales de plantas de Zea mays. La figura A (esporas) y B (vesículas). La figura C y D muestran vesículas.

**Figura 2** Muestra los resultados obtenidos después de haber utilizado la técnica de Phillips y Haymann



La figura A muestra el viraje del color del medio además de una película blanquecina en la superficie. Colonias blanquecinas características de *Azospirillum sp* (B). Figura C, bacilos Gram (-). Siembra en medio rojocongo, colonias sospechosas de *A. brasilense*.

**Figura 2** Muestra los resultados obtenidos utilizando la técnica de Carreño

## Discusión

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento 1 en los tres genotipos (H-565, V-236 y Criollo) tuvo las mejores características en cuanto a DT y NH, de igual manera, en el tratamiento 2 se observaron propiedades similares. Esto demuestra que la adición de composta ha mejorado el crecimiento de las plantas de maíz, aún sin haber utilizado fertilización química. El efecto positivo en las plantas de maíz ocasionado por la aplicación de composta se debe posiblemente a sus atributos físico-químicos, que se complementan con las elevadas concentraciones de macro y micro elementos exhibidos por el suelo (ver tabla 3), favoreciendo de esta manera la nutrición y el desarrollo del cultivo (NOM-021-SEMARNAT-2000). En cuanto a la composta, los tres elementos principales considerados en la nutrición de los cultivos (N, P y K) (ver tabla 3), se observan por debajo de los reportados por Álvarez-Solís *et al.* (2010), N=0.095%, P=0.65% y K=0.83%. Por su parte el contenido de MO fue de 27.36% (ver tabla 9), considerado alto en comparación con el suelo, este alto contenido de MO es una fuente importante de liberación de nutrientes (Pérez, *et al.*, 2008).

En contra parte, se esperaba que los tratamientos de los genotipos H-565 (T5 y T6), V-236 (T3 y T5) y Criollo (T6), a los cuales se les adicionó *G. intraradices* y *A. brasilense* en conjunto con la composta, mostraran características de crecimiento favorables, sin embargo esto no sucedió por los altos niveles de nutrientes en el suelo y composta, por lo que la micorriza no trabaja por el exceso de Fósforo y la bacteria por exceso de Nitrógeno. Además, las interacciones microbianas en la rizósfera no siempre son mutualistas y por ende no se obtiene un efecto sinérgico que favorezca el crecimiento y desarrollo de las plantas (Adriano, *et al.*, 2011).

Existen investigaciones donde se ha podido comprobar la potenciación de la estimulación en el crecimiento y demás parámetros en las plantas, con la aplicación de *Azospirillum* conjuntamente con HMA (Miyasaka y Habte, 2003); pero en otras los resultados no han sido favorables debido que la co-inoculación de los microorganismos necesita de condiciones adecuadas para su establecimiento e interacción positiva que conduzca a la efectividad de la simbiosis micorrízica; y a su vez que ésta garantice una absorción de nutrientes suficientes para satisfacer las exigencias de la estimulación. Los resultados expuestos en el análisis microbiológico de la composta (ver tabla 4) demostraron la existencia de *S. aureus*, aunque sin presentar un crecimiento significativo para poder afectar la salud de quien manipula la composta (NMX-F-310-1978). Diversos autores han reportado el crecimiento de esta bacteria en muestras de vermicomposta, debido a que los componentes de la misma son de origen fecal animal (Ogefere, *et al.*, 2010), sin embargo, la composta utilizada no tiene estos orígenes. Se observó también, el crecimiento de *P. aeruginosa*, esto se debe principalmente a la capacidad de la bacteria para soportar altas temperaturas, lo cual la hace resistente al proceso de autoesterilización que tiene la composta. Así mismo, Pérez, *et al.* (2010) mostraron que la composta de pollinaza presenta densidades mayores del género *Pseudomonas* ( $420 \times 10^3$  UFC/g), esto se debe a la capacidad de adaptación que tiene éste microorganismo.

A pesar de que en la composta analizada se encuentran metales pesados (ver tabla 5), las concentraciones de As, Cd, Cr, Cu, Ni y Pb están por debajo de los niveles máximos permisibles en NTC 5167 2004; del mismo modo, estas concentraciones son inferiores a las permitidas por la Norma 503 de EPA.

Todo parece indicar que estos niveles no afectan la microbiología nativa o externa que pudiera existir en la composta, ya que se ha observado un mayor desarrollo de volumen radical, una cantidad elevada de vesículas e hifas del género *Glomus* en los tratamientos a los cuales se les adicionó biofertilizantes (principalmente el T6). Es importante señalar que este tipo de microorganismos desempeñan un papel importante en la biorremediación de suelos contaminados por metales pesados, ya que existen evidencias de comunidades microbianas como los géneros de *Aspergillus sp.*, *Micrococcus sp.* y principalmente los del género *Glomus* que participan en la bioacumulación de metales. (Congeeveram, *et al.*, 2007).

La figura 1 muestra la diversidad de micorrizas arbusculares que hubo en las raíces de todos los tratamientos, esto demuestra la capacidad de los HMA para adaptarse a cualquier medio. Por su parte en la figura A y B se observa las hifas, vesículas y esporas características de *G. intraradices*, lo cual corrobora la existencia exclusiva de este hongo en el tratamiento 6. Sin embargo, los tratamientos 3, 4 y 5 presentaron una disminución en el porcentaje de colonización micorrizica debido posiblemente a la presencia de otros microorganismos en la rizosfera y la capacidad del hongo para establecerse y competir con la microflora nativa, pudiendo afectar su respuesta a la inoculación (Pecina-Quintero, *et al.* 2005). Finalmente, en la figura C y D se muestran vesículas de otros HMA que se encontraban de forma nativa en el suelo. Esto implica que este tipo de hongos es un componente importante en el reciclaje y absorción de nutrientes en un agroecosistema (Iglesias, *et al.* 2010). En el caso de *A. brasilense* se encontró la bacteria en casi todos los tratamientos (ver figura 2), a excepción del T7 (genotipo V-236) lo cual corrobora la capacidad de la bacteria para adaptarse a cualquier microambiente, además de encontrarse de manera nativa en el suelo.

Aguirre, *et al.* (2008), mencionaron que la respuesta de las bacterias y hongos micorrízicos puede variar con la naturaleza del suelo, condiciones ambientales y cuando se introducen por primera vez en un ambiente determinado (debido a que compiten con poblaciones nativas y nemátodos micófagos) (Linderman, 1992).

### Conclusiones

- Se demostró que los metales que se encontraban en la composta no rebasaban los límites máximos permisibles expuestos en normas internacionales, esto ayudo a que el crecimiento de *A. brasilense* y *G. intraradices* no fuera interrumpido.
- La composta presentó atributos físico-químicos, que al complementarse con las elevadas concentraciones de macro y micro elementos exhibidos por el suelo, favorecen la nutrición tanto del cultivo como el mantenimiento de los biofertilizantes. Además, el crecimiento de microorganismos patógenos no mostró resultados significativos, lo cual es indicativo de que no son de origen fecal y por ende no ocasionan daño a la salud del humano.
- La composta en conjunto con el suelo mejoran significativamente el crecimiento de la planta y el rendimiento de grano, aún sin la adición de *A. brasilense* y *G. intraradices*.
- Se logró el aislamiento de los dos biofertilizantes en todos los tratamientos de los tres genotipos, a excepción del T7 del genotipo V-236.

## Referencias

Álvarez-Solís, J., Gómez-Velasco, D., León-Martínez, N., Gutiérrez-Miceli, F., (2010). Integrated management of inorganic and organic fertilizers in maize cropping. *Agrociencia*. 44 (5): 578-584.

Congeeveram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M. y Thamaraiselvi, K., (2007). Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Material*. 146(1): 270-277.

Iglesias, L., Salas, E., Leblanc, H., Nygren, P., (2010). Morfología de los hongos micorrízicos arbusculares en las raíces de *Theobroma cacao* e *Inga edulis* en un experimento de inoculación cruzada. *Rev. Tierra tropical*. 6 (1): 42.

Ogefere, H., Ogbimi, A. y Omoregie, R., (2010). Microbiology of composting pig waste: Comparison of vermicomposting and open heap techniques. *Malaysian Journal of Microbiology*. 6(1): 25-29.

Pérez, R., Pérez, A., Vertel, M., (2010). Nutritional, physical-chemical and microbiological characterization of three organic fertilizers to be used in agricultural ecosystems of pastures located in the subregion Sabanas, department of Sucre, Colombia. *Revista Tumbaga*. 5: 27-37.